



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Genética y Biotecnología**

**Producción de citoquinas de respuesta inmune celular  
en ratones inmunizados y tratados con fucoidan de  
*Lessonia trabeculata* (Phaeophyceae, laminariales)**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista  
Biotecnóloga**

**AUTOR**

**Dora Luisa RIOS MATOS**

**ASESOR**

**Dra. Libertad ALZAMORA GONZALES**

**Lima, Perú**

**2020**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Rios, D. (2020). *Producción de citoquinas de respuesta inmune celular en ratones inmunizados y tratados con fucoidan de Lessonia trabeculata (Phaeophyceae, laminariales)*. Tesis para optar el título de Bióloga Genetista Biotecnóloga. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## Hoja de metadatos complementarios

- **Código ORCID del autor:**

0000-0002-9665-1515

- **Código ORCID del asesor:**

0000-0002-7425-7453

- **DNI o pasaporte del autor:**

70502133

- **Grupo de investigación:**

Inmunomoduladores de Origen Natural y Sintético (MODULANS)

- **Institución que financia la investigación:**

- Proyecto Innóvate: “Desarrollo e implementación de procesos tecnológicos de validación analítica y bioactiva para fucoïdan de algas pardas como suplementos nutricionales para humanos”, Convenio N° 143-PNICP-PIAP-2015.
- Proyecto de Investigación B18100301 del G.I. “Inmunomoduladores y antitumorales de origen natural y sintético”, financiado por el Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos
- Programa de Promoción de Tesis de Pregrado del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Código del Proyecto B19100024 aprobado mediante Resolución Rectoral N°04692-R-19

- **Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación:**

Ciudad Universitaria de la UNMSM

Calle Germán Amézaga N° 375 – Edificio Jorge Basadre, Ciudad Universitaria, Lima.

Coordenadas geográficas: 12°03'30''S 77°05'00''O

- **Año o rango de años que la investigación abarcó:**

2017-2019



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

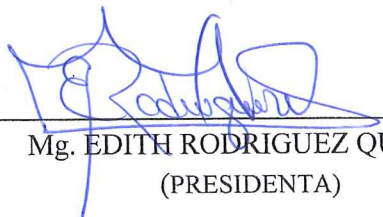
Siendo las 10.10 horas del 20 de enero de 2020, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** de **DORA LUISA RIOS MATOS**.


Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 019-EPGB-2019, la titulando expuso su tesis: **"PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS DE RESPUESTA INMUNE CELULAR EN RATONES INMUNIZADOS Y TRATADOS CON FUCOIDAN DE *Lessonia trabeculata* (PHAEOPHYCEAE, LAMINARIALES)"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18, calificativo: aprobado con mención honrosa

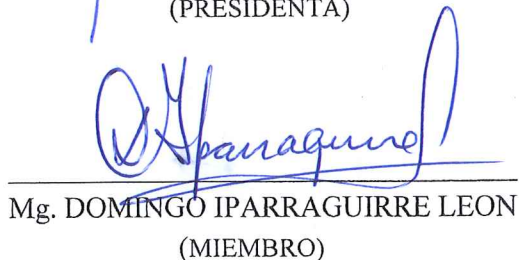
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** a **DORA LUISA RIOS MATOS** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

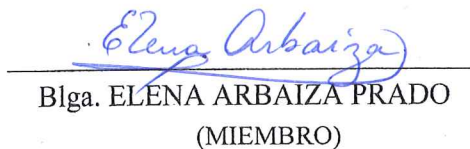
Siendo las 12 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 20 de enero de 2020.

  
Mg. EDITH RODRIGUEZ QUISPE  
(PRESIDENTA)

  
Dra. LIBERTAD ALZAMORA GONZALES  
(ASESORA)

  
Mg. DOMINGO IPARRAGUIRRE LEON  
(MIEMBRO)

  
Blga. ELENA ARBAIZA PRADO  
(MIEMBRO)

El presente estudio es parte del Proyecto “Desarrollo e implementación de procesos tecnológicos de validación analítica y bioactiva para fucoidan de algas pardas como suplementos nutricionales para humanos”. Convenio N° 143-PNICP-PIAP-2015, y del Proyecto de Investigación B18100301 del G.I. “Inmunomoduladores y antitumorales de origen natural y sintético”, financiado por el Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM.

La tesis ha sido parcialmente financiada por el Programa de Promoción de Tesis de Pregrado del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM. Código del Proyecto B19100024 aprobado mediante Resolución Rectoral N° 04692-R-19.

### **Dedicatoria**

Dedicado a las personas más importantes en mi vida: mi familia, que estuvieron a mi lado en los buenos y malos momentos. Este trabajo, que es mi logro más importante hasta el momento, va para ellos.

## **Agradecimientos**

A mis padres David y Mónica, por darme la vida y, a pesar de todas las dificultades que hemos tenido, habernos sacado adelante a mi hermana y a mí, por hacernos personas de bien.

A mi hermana Mónica, por haber nacido y crecido juntas, no habría podido pedir una hermana mejor que tú, por ser de las pocas personas que creía en mí y por haberme brindado tu ayuda y comprensión en muchas de las cosas que hemos pasado a nivel familiar.

A mi abuelita Edda, por ser uno de los más grandes motivos para sacar adelante este trabajo, por tu apoyo y amor durante toda mi vida, y por ser como mi segunda madre, siempre atenta y paciente.

A la Dra. Libertad Alzamora, por darme la oportunidad de realizar mi tesis en el laboratorio y sobre todo por su infinita paciencia conmigo, a pesar que la ponía a prueba muchísimas veces.

Al Mg. Erasmo Colona, por su ayuda y paciencia al enseñarme los protocolos que he empleado en este trabajo.

A Andrés, por el tiempo que estuvimos cuidando, alimentando y suministrando extracto a los ratones, por todo el trabajo duro, la amanecida para procesarlos y tus ánimos cuando ya estaba por “tirar la toalla”.

A Mónica, por ser mi compañera y mi mejor amiga, por estar en los momentos más complicados durante estos años, pasar muchos sucesos y entenderme como nadie más lo ha hecho.

A mis compañeros de laboratorio que también nos brindaron una mano en el trabajo con los ratones: Mauro, Rosa y Mary; y a los que vinieron luego para aprender las



técnicas empleadas: Estela y Fabrizio, por todas las ayudantías en las que hemos trabajado juntos, y también por ser buenos amigos.

A aquellos amigos que siempre estuvieron a mi lado, desde que los conocí hace cuatro años en el grupo de estudio ADCA: Enzo, Angel, Xiomara, porque con ustedes aprendí sobre el trabajo en equipo, por todos esos momentos serios y de ocio, los llevaré siempre en mi corazón. A mis compañeros de base, por los años en los que estuvimos estudiando y por aquellos lazos de amistad formados.

Y sobre todo, a los lectores de este trabajo, con la esperanza de que les sea de utilidad y haya logrado aportar, con este pequeño grano de arena, a la investigación de los recursos naturales que tenemos en nuestro país.

## Índice general

Lista de abreviaturas	i
Lista de tablas	iii
Lista de figuras	iv
Resumen	vi
Abstract	viii
I. Introducción	1
II. Marco teórico	3
II.1 Algas	3
II.1.1 <i>Lessonia trabeculata</i>	3
A) Descripción botánica	4
B) Compuestos fitoquímicos	5
C) Actividad biológica de <i>Lessonia trabeculata</i>	5
II.2 El fucoïdan	6
II.2.1 Estructura	6
II.2.2 Métodos para la extracción del fucoïdan	7
II.2.3 Funciones biológicas	8
II.3 El sistema inmune y la respuesta inmunitaria	9
II.3.1 Inmunidad innata	10
II.3.2 Mecanismos efectores de la inmunidad innata	11
A) Especies reactivas de oxígeno	12
B) Especies reactivas de nitrógeno	13
C) Inflamación	13
II.3.3 Inmunidad adaptativa	14
II.3.4 Respuesta inmune primaria y secundaria	15
II.4 Inmunomodulación	15
II.4.1 El extracto y el fucoïdan de <i>Lessonia trabeculata</i> como inmunomodulador	16
III. Hipótesis y objetivos	18
IV. Materiales y Métodos	19
IV.1 Material biológico	19
IV.2 Tratamientos e inmunizaciones	19
IV.3 Extracción de células del bazo de ratones inmunizados	23
IV.4 Obtención del suero de ratones inmunizados	23

IV.5 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) mediante la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT)	24
IV.6 Evaluación de la producción de óxido nítrico (NO) mediante la reacción de Griess	25
IV.7 Evaluación de la expresión de ARNm para las citoquinas TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ e IL-2	26
IV.7.1 Extracción de ARN total	26
IV.7.2 Síntesis de ADNc (RT-PCR)	27
IV.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional	28
IV.7.4 Electroforesis en gel de agarosa	30
IV.7.5 Análisis por cuantificación densiométrica	30
IV.8 Evaluación de la producción de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e IL-2 en suero de ratones inmunizados	31
IV.9 Análisis estadístico	33
V. Resultados	34
V.1 Evaluación de la producción de óxido nítrico (NO) y de especies reactivas de oxígeno (ROS) de ratones inmunizados	34
V.2 Evaluación de la expresión de ARNm para las citoquinas TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ e IL-2 en ratones inmunizados	35
V.3 Evaluación de la producción de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e IL-2 en suero de ratones inmunizados	40
VI. Discusión	45
VII. Conclusiones	53
VIII. Recomendaciones	54
IX. Referencias bibliográficas	55
X. Anexos	65

## **Lista de Abreviaturas**

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

DMSO: Dimetilsulfóxido

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas

ELLt: Extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*

ERO: Especies reactivas de oxígeno

ERN: Especies reactivas de nitrógeno

FFv: Fucoidan de *Fucus vesiculosus*

GRC: Glóbulos rojos de carnero

HRP: Peroxidasa de rábano

IFN- $\gamma$ : Interferón gamma

IL: Interleuquina

ip: Intraperitoneal

NBT: Nitroazul de tetrazolio

NED: N-naftil-etilendiamina

NO: Óxido nítrico

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pH: Potencial de hidrógeno

RIP: Respuesta inmune primaria

RIS: Respuesta inmune secundaria

rpm: Revoluciones por minuto

RPMI-1640: Medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute* 1640

RPMI-SBF: Medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute* 1640 suplementado con suero bovino fetal

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa retrotranscriptasa

TMB: Tetrametilbencidina

TNF: Factor de necrosis tumoral

Y-NBT: Nitroazul de tetrazolio amarillo

## **Lista de Tablas**

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Lessonia trabeculata* (Algaebase).

**Tabla 2.** Algunas citoquinas involucradas en los procesos inmunitarios.

**Tabla 3.** Grupos experimentales y controles para la investigación del efecto del extracto liofilizado rico en fucoïdan de *L. trabeculata* sobre la respuesta inmune celular en ratones BALB/c.

**Tabla 4.** Reacción de retrotranscripción de ARN a ADNc mediante el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis (ThermoScientific).

**Tabla 5.** Ciclos del PCR empleado para la detección de citoquinas.

## **Lista de Figuras**

**Figura 1.** Ejemplar de *Lessonia trabeculata* Villouta y Santelices.

**Figura 2.** Estructura del fucoidan de *Fucus vesiculosus* planteada por Patankar *et al.* (1993).

**Figura 3.** Interrelación entre la inmunidad innata y adaptativa.

**Figura 4.** Generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno antimicrobianas.

**Figura 5.** Respuesta inmune primaria y secundaria ante la infección.

**Figura 6.** Flujograma de trabajo para respuesta inmune primaria (RIP).

**Figura 7.** Flujograma de trabajo para respuesta inmune secundaria (RIS).

**Figura 8.** Obtención de esplenocitos de ratones inmunizados.

**Figura 9.** Obtención de suero de ratones inmunizados.

**Figura 10.** Evaluación del nivel de óxido nítrico en cultivo de esplenocitos.

**Figura 11.** Evaluación de la producción de ERO mediante el reactivo NBT en cultivos de esplenocitos.

**Figura 12.** Flujograma de extracción de RNA mediante el kit innuPREP RNA Mini (AnalytikJena).

**Figura 13.** PCR convencional.

**Figura 14.** Corrida electroforética.

**Figura 15.** Protocolo empleado para ELISA sándwich en la cuantificación de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2.

**Figura 16.** Evaluación de la producción de óxido nítrico (NO) en esplenocitos mediante la reacción de Griess.

**Figura 17.** Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en esplenocitos empleando el reactivo nitroazul de tetrazolio (NBT).

**Figura 18.** Evaluación de la expresión génica de TNF- $\alpha$  en esplenocitos.

**Figura 19.** Evaluación de la expresión génica de TNF- $\beta$  en esplenocitos.

**Figura 20.** Evaluación de la expresión génica de IFN- $\gamma$  en esplenocitos.

**Figura 21.** Evaluación de la expresión génica de IL-2 en esplenocitos.

**Figura 22.** Evaluación de la producción de TNF- $\alpha$  en suero mediante ELISA.

**Figura 23.** Cuantificación de TNF- $\alpha$  en suero mediante ELISA.

**Figura 24.** Evaluación de la producción de IFN- $\gamma$  en suero mediante ELISA.

**Figura 25.** Cuantificación de IFN- $\gamma$  en suero mediante ELISA.

**Figura 26.** Evaluación de la producción de IL-2 en suero mediante ELISA.

**Figura 27.** Cuantificación de IL-2 en suero mediante ELISA.



## Resumen

El fucoidan es un polisacárido extraído de algas pardas y ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades anticoagulantes, antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes, antitumorales, antiangiogénicas e inmunomoduladoras, que varían de acuerdo a la especie. *Lessonia trabeculata* es un alga parda del litoral peruano que se emplea en la industria alimentaria; sin embargo, tiene otros usos potenciales que deben ser investigados. El desarrollo de nuevos productos con actividad biológica a partir de estas algas requiere de evaluaciones *in vitro* e *in vivo*. El objetivo fue evaluar la producción de citoquinas de respuesta inmune celular: TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-2, la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y óxido nítrico (NO) en ratones inmunizados con glóbulos rojos de carnero (GRC) y tratados con diferentes concentraciones del extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, empleándose como control fucoidan de *Fucus vesiculosus*. Los ratones fueron tratados durante 14 días por vía oral, para evaluar la respuesta inmune primaria (RIP), y durante 28 días, para la respuesta inmune secundaria (RIS). Las ERO se evaluaron mediante el ensayo de reducción de nitroazul de tetrazolio, y el NO por la reacción de Griess. La expresión génica y la presencia de citoquinas séricas se determinaron mediante PCR convencional y ELISA de tipo sándwich, respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran que el extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* no influye en la producción de ERO ni NO, incrementa la expresión de TNF- $\alpha$  y la concentración en suero de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 e inhibe la expresión de TNF- $\beta$  en RIP, promueve la expresión de TNF- $\beta$  e IL-2, inhibe la expresión de TNF- $\alpha$  y reduce la concentración en suero de IL-2 en RIS. Se concluye que el extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* estimula la inmunidad celular en la respuesta primaria y secundaria, sin embargo, es necesario complementar estos resultados con posteriores investigaciones.

**Palabras clave:** Fucoïdan, *Lessonia trabeculata*, inmunomodulación, esplenocitos, respuesta inmune celular.

## Abstract

Fucoidan is a polysaccharide extracted from brown algae and has been widely studied for its anticoagulant, antiviral, anti-inflammatory, antioxidant, antitumor, antiangiogenic and immunomodulatory properties, which vary according to the species. *Lessonia trabeculata* is a brown alga of the Peruvian littoral that is used in the food industry, however, it has other potential uses that should be investigated. The development of new products with biological activity from these algae requires *in vitro* and *in vivo* evaluations. The objective was to evaluate the production of cytokines of cellular immune response: TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  and IL-2, the production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) in mice immunized with sheep red blood cells and treated with different concentrations of lyophilized extract rich in fucoidan of *Lessonia trabeculata*, being used as control fucoidan of *Fucus vesiculosus*. The mice were treated for 14 days orally, to evaluate the primary immune response (PIR), and for 28 days, for the secondary immune response (SIR). ROS were evaluated by the nitroblue reduction assay of tetrazolium, and NO by the Griess reaction. Gene expression and the presence of serum cytokines were determined by conventional PCR and sandwich ELISA, respectively. The results show that the lyophilized extract rich in fucoidan of *Lessonia trabeculata* does not influence the production of ROS or NO, increases the expression of TNF- $\alpha$  and the serum concentration of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-2 and inhibits the expression of TNF- $\beta$  in PIR, promotes the expression of TNF- $\beta$  and IL-2, inhibits the expression of TNF- $\alpha$  and reduces the serum concentration of IL-2 in SIR. It is concluded that the lyophilized extract rich in fucoidan from *Lessonia trabeculata* stimulates cellular immunity in the primary and secondary response; however, it is necessary to complement these results with further research.

**Key words:** Fucoidan, *Lessonia trabeculata*, immunomodulation, splenocytes, cellular immune response.

## I. INTRODUCCIÓN

Las algas marinas son empleadas en muchas industrias, como la alimentaria, farmacéutica, cosmética, debido a la gran cantidad de compuestos químicos (agar, alginatos, carragenano, ácidos grasos, polisacáridos, carotenoides) que poseen (Pal *et al.*, 2014). Se sabe que muchos de ellos tienen efecto en el sistema inmune, ya sea afectando las células inmunitarias o la secreción de anticuerpos, y también regula el estado de homeostasis (Ortuño-Sahagún *et al.*, 2017).

Uno de los metabolitos presentes en las algas son los polisacáridos de sus paredes celulares. En las algas pardas tenemos el fucoidan, polisacárido sulfatado, que posee potencial antiviral, antitumoral e inmunomodulador (Wijesekara *et al.*, 2011; Wijesinghe y Jeon, 2012).

La respuesta inmune puede ser modulada y direccionada a la eliminación de determinados agentes extraños para poder incrementarla o suprimirla, dependiendo de la naturaleza del agente. Esto se conoce como inmunomodulación, y funciona como ayuda complementaria en el tratamiento de diversas enfermedades, como infecciones, algunos tipos de tumores e inmunodeficiencias (Llauradó *et al.*, 2011). Buena parte de estos inmunomoduladores son de tipo sintético, y los costos para su obtención son muy elevados, por lo que se están buscando diversas alternativas que presenten efecto inmunomodulador que sean de tipo natural.

El fucoidan actúa como inmunomodulador sobre la respuesta inmune celular, ya que incrementa la expresión de citoquinas activadoras de linfocitos y macrófagos e inductoras de la respuesta inflamatoria (Jin *et al.*, 2014; Jang *et al.*, 2014; Halling *et al.*, 2015). La estructura del fucoidan influencia la presencia o ausencia del efecto inmunomodulador, y también afecta la potencia del mismo, por lo que es necesario estudiar la composición química y la estructura a fin de tener mayor conocimiento sobre sus efectos.

En el Perú se tiene el alga parda *Lessonia trabeculata*, del orden Laminariales, que se emplea en la industria alimentaria. Se ha reportado que tiene alto contenido de polisacáridos, entre los que se encuentra el fucoïdan, que es de bajo peso molecular (105 kDa) (Qu *et al.*, 2014). Sin embargo, no hay muchos reportes sobre la actividad inmunológica del fucoïdan de *Lessonia trabeculata*.

El objetivo del estudio fue determinar la producción de citoquinas de respuesta inmune celular primaria y secundaria en ratones BALB/c tratados con extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata* nativa e inmunizados con glóbulos rojos de carnero, además de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y óxido nítrico (NO) en sus esplenocitos.

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **II.1 Algas**

Las algas son un grupo muy heterogéneo, que es usado mayormente en la industria alimentaria. Esto se debe a su composición: bajo contenido lipídico, alta concentración en polisacáridos, vitaminas, minerales y ácidos grasos poliinsaturados. Se dividen en tres grandes grupos: algas verdes, pardas y rojas. Esta división es en base al pigmento primordial presente en cada una de ellas: en el caso de las algas verdes, predomina la clorofila, en las algas pardas predomina la fucoxantina, y en las algas rojas tenemos la ficoeritrina y la ficocianina. Dada la gran cantidad de compuestos presentes en ellas, son consideradas una gran fuente de compuestos bioactivos que pueden tener un uso potencial en la industria farmacéutica (Gupta & Abu-Ghannam, 2011).

#### **II.1.1 *Lessonia trabeculata***

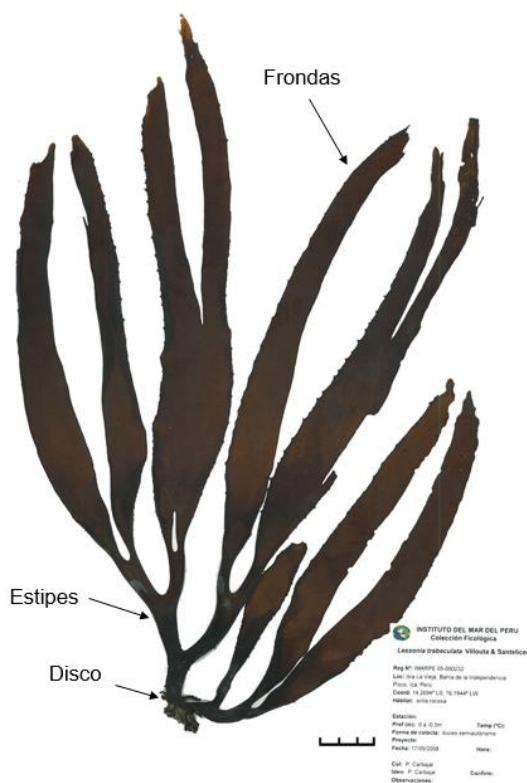
También conocida como “palo blanco” en nuestro país, es un alga parda perteneciente al orden Laminariales (Tabla 1), que se puede encontrar desde la caleta La Grama, en Ancash (9°46'S) hasta el sur de Chile (54°S) (Villouta y Santelices, 1986). Se emplea como fertilizante, además los talos contienen alta cantidad de algina, la cual se emplea para producir alginato, que se utiliza en la industria alimentaria como espesante (Caja *et al.*, 2004).

**Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Lessonia trabeculata* (Guiry y Guiry, 2019, Algaebase).**

<i>Dominio</i>	Eukaryota
<i>Reino</i>	Chromista
<i>Phylum</i>	Ochrophyta
<i>Clase</i>	Phaeophyceae
<i>Subclase</i>	Fucophycidae
<i>Orden</i>	Laminariales
<i>Familia</i>	Lessoniaceae
<i>Género</i>	<i>Lessonia</i>
<i>Especie</i>	<i>Lessonia trabeculata</i> Villouta y Santelices

#### **A) Descripción botánica**

Presenta un esporofito erecto, de hasta 3 m de alto, unidas al sustrato por un disco masivo de fijación formado por hapterios unidos y que puede alcanzar hasta 20 cm de alto. Desde el disco se origina un número variable de estípites, entre 2 a 30, raramente hasta 50. Estos estípites son rígidos, fuertes, débilmente aplanados, divididos subdicotómicamente en las porciones medias. En las porciones más apicales ellos se dividen repetidamente y se aplanan, originando las láminas (Vera, 2014). La corteza de los estípites y las frondas con aberturas de forma irregular están atravesadas regularmente por filamentos ramificados, elongados y multicelulares, conocidos como trabéculas (Villouta & Santelices, 1986). Un ejemplar puede ser visualizado en la Figura 1.



**Figura 1. Ejemplar de *Lessonia trabeculata* Villouta y Santelices.** Recolectado en Isla La Vieja, Bahía de la Independencia, Pisco, Ica, Perú. Se señalan las partes más importantes del alga. (Colectado e Identificado por Patricia Carbajal, 2008).

## B) Compuestos fitoquímicos

Se ha encontrado, en el extracto etanólico de frondas de *Lessonia trabeculata* recolectadas en Las Cruces, Chile: laminarina, polisacáridos que contienen fucosa, ácido algínico, y D-manitol (Matsushiro & Zambrano, 1990), otros estudios, como el de Fernandez (2017), ha determinado la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides en un extracto metanólico de algas obtenidas en Ilo, Perú.

Qu *et al.* (2014) lograron aislar el fucoidan de *Lessonia trabeculata*, obtenida de nuestro litoral, el cual contiene fucosa (21.53%), sulfato (16.39%) y proteínas (1.8%), además de bajas proporciones de azúcares adicionales, como galactosa, manosa, glucosa.



### **C) Actividad biológica de *Lessonia trabeculata***

Fernandez (2017) ha determinado la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Lessonia trabeculata*, y ha encontrado que no hay actividad citotóxica frente a las líneas celulares A549, HBL-100, HeLa, SW1573, T-470 y WiDr. Ruiz (2018) aisló el fucoidan de *Lessonia trabeculata* mediante precipitaciones sucesivas con etanol 96°, complejamiento con cloruro de cetilpiridinio e irradiación gamma. Este fucoidan presenta notable actividad anticoagulante. Horna (2018) empleó el fucoidan de *Lessonia trabeculata* sobre células de carcinoma laríngeo humanas (Hep-2), determinando que presenta actividad citotóxica.

## **II.2 El fucoidan**

Es un tipo de polisacárido que se encuentra en algas pardas y en algunos invertebrados marinos, como erizos de mar y pepinos de mar. Presenta L-fucosa y grupos ésteres de sulfato, usualmente está constituida como una cadena principal de residuos de  $\alpha$ -L-fucopiranosas y presentan diversas sustituciones (Ale & Meyer, 2013). Químicamente, los fucoidanos componen la familia de los polisacáridos sulfatados que contienen fucosa (FCSPs, por sus siglas en inglés). Fue aislado por primera vez en 1913 por Kylin, y 60 años después se empezó a estudiar las diversas estructuras que presenta (Li *et al.*, 2008).

### **II.2.1 Estructura**

La estructura del fucoidan varía de acuerdo a la fuente de donde es obtenida. Por ejemplo, el fucoidan de *Fucus vesiculosus* presenta una composición química simple (fucosa y sulfatos), pero la composición química de la mayoría de fucoidanos es más compleja: pueden tener otros monosacáridos, como manosa, galactosa, glucosa, xilosa, etc, y ácidos urónicos, inclusive también pueden presentar grupos acetilados y proteínas (Li *et al.*, 2008).

El fucoidan de algas pardas está compuesto generalmente por una cadena principal de residuos de  $\alpha(1\rightarrow3)$ -L-fucopiranososa, o  $\alpha(1\rightarrow3)$  y  $\alpha(1\rightarrow4)$ -L-fucopiranosilos ligados, que pueden ser sustituidos con sulfatos o acetatos, o presentar ramificaciones conteniendo fucopiranosas u otras unidades glicosiladas. Muchos fucoidanos reportados también presentan cantidades pequeñas de monosacáridos, los cuales podrían provenir de contaminación o ser parte realmente de la estructura del fucoidan (Ale & Meyer, 2013).

Un ejemplo de fucoidan de estructura simple es el de *Fucus vesiculosus*. Esta fue determinada por Patankar *et al.* (1993), señalando que la región central del fucoidan está compuesta por un polímero de  $\alpha(1\rightarrow3)$ -fucosa ligada a grupos sulfato sustituidos en la posición cuatro en algunos de los residuos de fucosa, y también la fucosa se une a este polímero central para formar ramificaciones, una por cada 2 a 3 residuos de fucosa dentro de la cadena, como se muestra en la Figura 2.

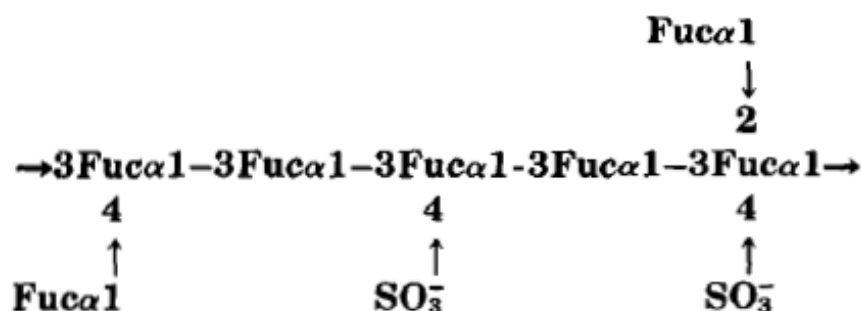


Figura 2. Estructura del fucoidan de *Fucus vesiculosus* (Patankar *et al.*, 1993).

Como se mencionó anteriormente, los fucoidanos pueden presentar diversos residuos adicionales a su cadena principal. Estas estructuras adicionales ejemplifican la biodiversidad natural de los fucoidanos, siendo que se puede observar estas diferencias entre los órdenes taxonómicos que componen la clase Phaeophyceae, como Fucales, Laminariales y Ectocarpales, e incluso entre miembros del mismo orden, esto se observa en el Anexo 1. Al tener tan variada composición, se ha

determinado que no hay una estructura básica consistente del fucoidan (Ale & Meyer, 2013).

### **II.2.2 Métodos para la extracción del fucoidan**

La extracción está influenciada por la naturaleza química, el método de extracción y la presencia de sustancias interferentes. En el caso de las algas pardas, el contenido de polisacáridos varía de acuerdo a las especies, y pueden ser extraídos usando agua o solventes orgánicos. Algunos de estos polisacáridos pueden perder su actividad mediante este proceso, por lo que también se emplean enzimas, como liasas, para mantener su estructura y obtener mayor eficiencia en el proceso de extracción (Wijesinghe & Jeon, 2012).

Para que el fucoidan extraído mantenga su peso molecular original, el contenido de ésteres de sulfato y la posición de los sulfatos, se necesita emplear cromatografía o fraccionamiento, lo cual genera mayor tiempo en el proceso de extracción. Las algas pardas son remojadas en soluciones acídicas o acuosas, a temperaturas de 70 a 10°C por muchas horas, luego continúa una precipitación con etanol, posteriormente se centrifuga para eliminar las sales y moléculas pequeñas que contenga la mezcla. Luego, el precipitado es lavado, disuelto y tratado con cloruro de calcio o bromuro de cetil-trimetiamonio para formar nuevamente un precipitado, el cual es dializado y liofilizado para obtener un extracto crudo. Ya que el extracto crudo de fucoidan contiene alginato de sodio, proteínas, pigmentos, y otras impurezas, es necesario emplear otras técnicas para obtener un fucoidan purificado, como la cromatografía de columna: mediante filtración en gel o intercambio iónico (Shen *et al.*, 2018).

### **II.2.3 Funciones biológicas**

El fucoidan presenta múltiples actividades biológicas, como la anticoagulante, antiviral, antiinflamatoria, antioxidante, antitumoral e inmunomoduladora, además de una baja toxicidad, por lo que se han realizado muchos estudios para determinar cómo actúan y

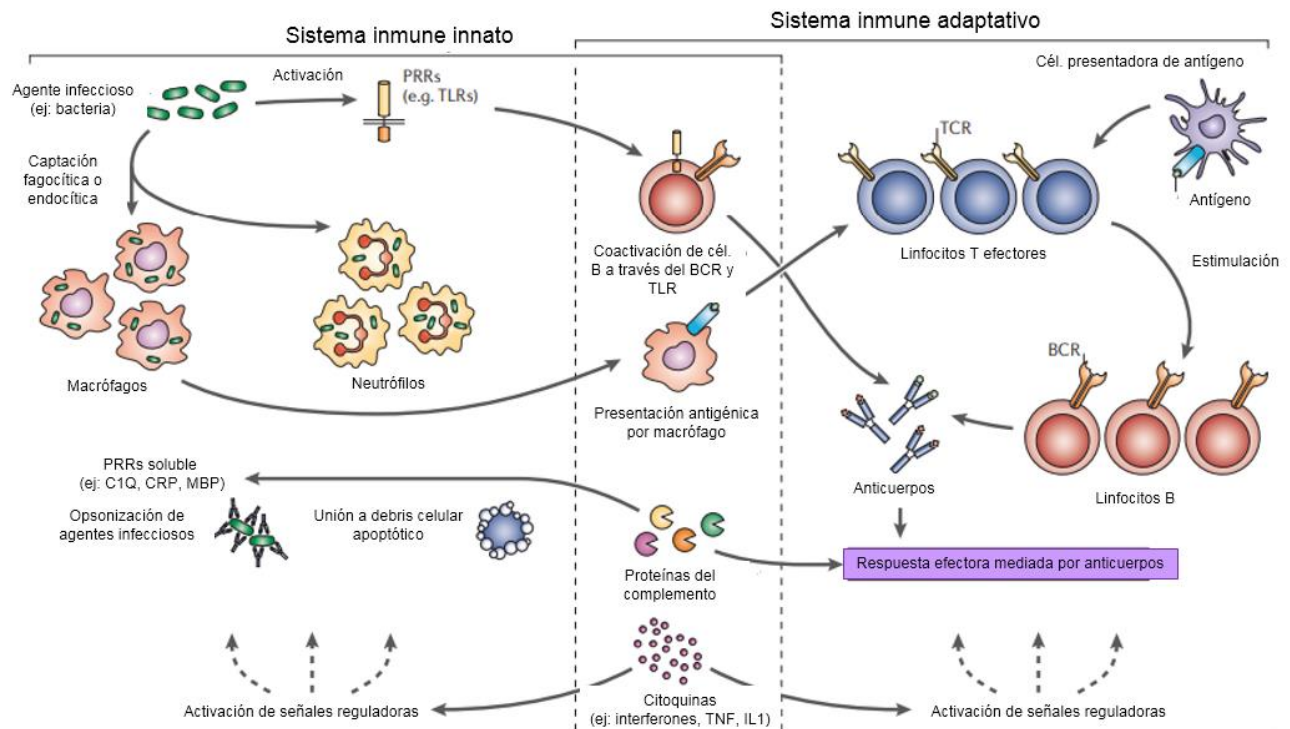
qué partes de su estructura son las que le confieren los diversos tipos de actividades biológicas que posee (Shen *et al.*, 2018).

Se ha demostrado que el fucoidan de *Ecklonia cava* presenta actividad anticoagulante, inhibiendo la actividad biológica de algunas serinproteasas, como los factores activados II, VII y X de la cascada de coagulación (Jung *et al.*, 2007). Otro fucoidan con esta actividad es el de *Lessonia vadosa*, en especial su fracción nativa (Chandía & Matsuhiro, 2008). Cumashi *et al.*, (2007) probaron diferentes fucoidanos provenientes de distintos tipos de algas pardas, y la que tuvo menor actividad anticoagulante fue la de *Cladosiphon okamuranus*, la cual posee menor cantidad de sulfato en su cadena principal. Esto quiere decir que la presencia abundante de sulfato en la cadena principal de fucoidan permite que tenga mayor actividad anticoagulante.

También es conocido que el fucoidan presenta potencial actividad antitumoral: el fucoidan de *Saccharina japonica* y de *Undaria pinnatifida* inhiben la proliferación y la formación de colonias en líneas celulares de cáncer de mama (T-47D) y de melanoma (SK-MEL-28) (Vishchuk *et al.*, 2011). El fucoidan de *Fucus vesiculosus* presenta un efecto antitumoral en células de cáncer de colon humano mediante la inhibición de su crecimiento y por apoptosis (Han *et al.*, 2015).

### **II.3 El sistema inmune y la respuesta inmunitaria**

El sistema inmune es un conjunto de células y moléculas responsables de la protección del organismo contra agentes internos o externos que el organismo pueda reconocer como extraños. La respuesta inmune es el conjunto de mecanismos que son desencadenados contra el agente extraño que ingrese al organismo. Se podría dividir la respuesta inmune en dos grupos que están interrelacionados entre sí: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Owen *et al.*, 2014; Abbas *et al.*, 2015). Las interacciones entre ambas se observan en la Figura 3.



**Figura 3. Interrelación entre la inmunidad innata y adaptativa.** Se pueden observar los mecanismos de reconocimiento (receptores de patrones de reconocimiento, o PRRs, para la respuesta inmune innata, y receptores de linfocitos T y B, para la respuesta inmune adaptativa), y los mecanismos efectores (fagocitosis, opsonización en la inmunidad innata, y producción de anticuerpos y acción de los linfocitos T efectoros, en la inmunidad adaptativa). También es posible ver los puentes entre ambos tipos de respuestas, como son la producción de citoquinas, como los interferones, factores de necrosis tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1), la presentación antigénica mediada por macrófagos, la coactivación de linfocitos B a través de los receptores Toll-like (TLRs), y las proteínas del complemento. (Gregersen y Behrens, 2006).

### II.3.1 Inmunidad innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra los agentes extraños para el organismo. Incluye mecanismos de reconocimiento que se encuentran acoplados a sistemas de señalización intracelular, que pueden ser moleculares y celulares. La inmunidad innata permite que se establezca un ambiente favorable para que se pueda desarrollar la respuesta de tipo adaptativa. Sus principales componentes son: barreras físicas y químicas (la piel, mucosas, sustancias antimicrobianas), células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas, linfocitos NK, y proteínas sanguíneas (sistema de complemento, mediadores inflamatorios) (Chabalgoity *et al.*, 2006; Abbas *et al.*, 2015).

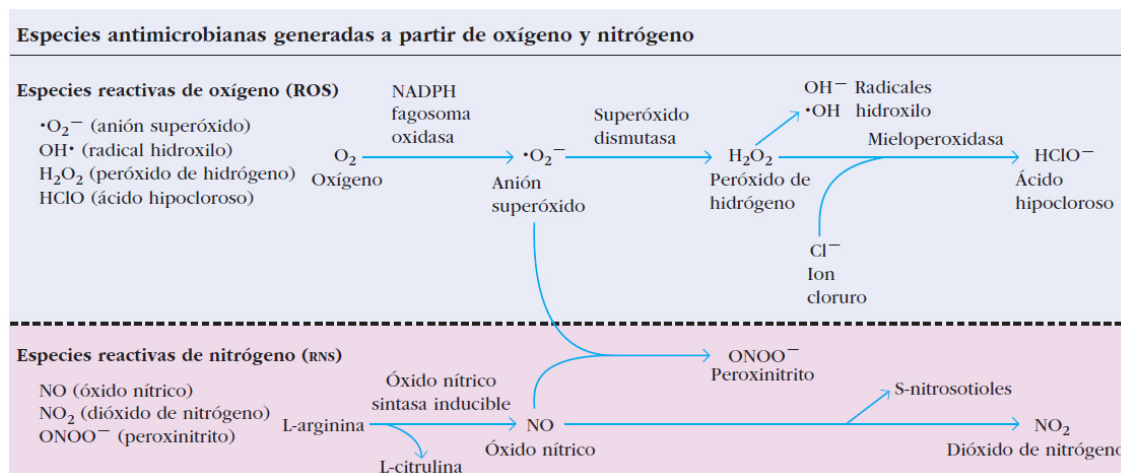
El problema más grande de este tipo de inmunidad es el tener diversidad limitada, ya que, al ser células maduras que provienen de una línea germinal específica, no pueden variar sus receptores en base a cada agente patógeno que ingresa al organismo. Por esto, emplean los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, en inglés) para poder identificar si un agente extraño que haya ingresado al organismo es patógeno o no (Medzhitov & Janeway Jr, 1997; Gregersen & Behrens, 2006).

### **II.3.2 Mecanismos efectores de la inmunidad innata**

Existen diversos mecanismos efectores de la inmunidad innata, como son la fagocitosis y la opsonización, además, se producen diversos tipos de citoquinas que producen inflamación, que es un proceso de reclutamiento y activación de células y moléculas al sitio de infección (Owen *et al.*, 2014).

La fagocitosis consiste en el reconocimiento e ingestión de partículas mayores a 0.5  $\mu\text{m}$  mediante células conocidas como fagocitos, los cuales pueden ingerir patógenos microbianos y también células apoptóticas. Estos fagocitos presentan receptores de reconocimiento de patrones (PRR), los cuales reconocen los PAMPs. Luego del reconocimiento, los receptores desencadenan señales que permiten la formación del fagosoma, y su posterior unión al lisosoma, conocido como fagolisosoma, el cual ayuda a la digestión de las partículas extrañas (Rosales & Uribe-Querol, 2017).

El fagolisosoma contiene muchos agentes antimicrobianos, como proteínas, péptidos antimicrobianos, pH bajo, enzimas hidrolíticas y moléculas especializadas que median el ataque oxidativo, como las especies reactivas de oxígeno (ERO), y especies reactivas de nitrógeno (ERN), que dañan componentes intracelulares (Owen *et al.*, 2014). La formación de estas moléculas se observa en la Figura 4.



**Figura 4. Generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno antimicrobianas.** Se tiene que las especies reactivas de oxígeno se producen a partir de la oxidación del oxígeno por la NADPH oxidasa, y la producción de anión superóxido, el cual, al ser procesado por la superóxido dismutasa, produce peróxido de hidrógeno que genera radicales hidroxilo. Para la producción de especies reactivas de nitrógeno se necesita la enzima óxido nítrico sintasa inducible, el cual genera, a partir de L-arginina, óxido nítrico (Owen *et al.*, 2014).

### A) Especies reactivas de oxígeno

Los ERO son formados generalmente como consecuencia del proceso respiratorio dado en las mitocondrias. El anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) se produce, en condiciones normales, a 1-2% a partir de  $\text{O}_2$ , mediante la enzima NADPH oxidasa, que es parte de la cadena respiratoria. Los fagocitos presentan NADPH oxidasa en la membrana plasmática, y esta enzima requiere alta cantidad de oxígeno para poder producir ERO, por lo que la captación y consumo de oxígeno por los fagocitos en esas circunstancias se le conoce como estallido respiratorio. Cuando el anión superóxido se encuentra en presencia de la enzima superóxido dismutasa, se puede convertir en peróxido de hidrógeno, que puede generar radicales hidroxilo, los cuales ocasionan daños en el ADN (Figura 4) (Moslen, 1994; Fang, 2004; Vernon y Tang, 2013; Owen *et al.*, 2014)

Para detectar la producción de anión superóxido en los fagocitos se emplean múltiples ensayos, uno de ellos es el ensayo de reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT test, en inglés), que se ha empleado como técnica para diagnosticar la enfermedad granulomatosa crónica (Baehner *et al.*, 1976), y se basa en la detección cualitativa del anión superóxido producido en los fagocitos durante el estallido respiratorio.

## **B) Especies reactivas de nitrógeno**

La producción de ERN, en específico de óxido nítrico (NO, en inglés), se da mediante la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la cual se une a la L-arginina para producir citrulina y NO (Figura 4). Esta producción se da mediante una cascada de señalización que inicia a partir del reconocimiento del patógeno por medio de los PRRs y citoquinas proinflamatorias, como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , las cuales desencadenan la transcripción de iNOS (Bogman, 2001). El efecto antimicrobiano del NO consiste en la inhibición de la respiración bacteriana, también de la ribonucleótido reductasa, la cual limita la reparación del ADN, y junto con el peróxido de hidrógeno puede potenciar el daño oxidativo (Fang, 2004).

Para poder cuantificar la cantidad de NO que se produce en los fagocitos es necesario considerar que su vida media es de aproximadamente de 1 a 30 segundos en la matriz biológica, por lo que las técnicas para cuantificarlo incluyen el emplear sus derivados, como son el nitrito y el nitrato, como un indicador de producción de NO. Una de estas técnicas es la reacción de Griess (Anexo 2, Sun *et al.*, 2003).

## **C) Inflamación**

La inflamación es una de las respuestas principales que el sistema inmune innato emplea ante una infección. Consiste en la acumulación de leucocitos, proteínas plasmáticas y líquidos derivados de la sangre en un tejido extravascular infectado. Se activa en minutos a horas a partir de la detección de la infección, y puede durar días. Implica el reclutamiento y activación de linfocitos y monocitos, y para que las células reclutadas puedan actuar en la zona de inflamación, requieren de citoquinas proinflamatorias, las cuales actúan, en su mayoría, en la célula que la origina, como son los macrófagos tisulares y células dendríticas (Abbas *et al.*, 2015). Algunas de las citoquinas involucradas en este proceso son detalladas en la Tabla 2.



### II.3.3 Inmunidad adaptativa

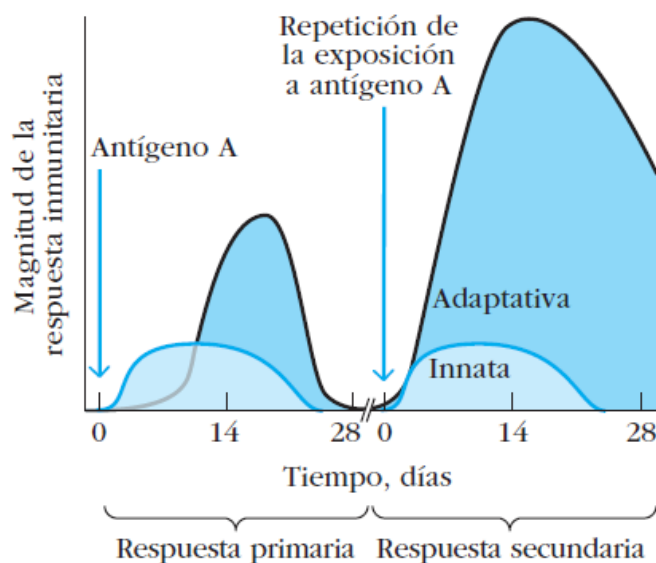
La inmunidad adaptativa es la respuesta más afinada ante la infección. Emplea para este fin los linfocitos B y T, que necesitan más tiempo en activarse, pero tienen la ventaja de ser más específicas ante el antígeno que está produciendo la infección. Este tipo de respuesta se da a partir de los 6 días posteriores al proceso infeccioso. Además, la respuesta inmune adaptativa permite la generación de memoria. Los mecanismos que actúan en la inmunidad adaptativa son: la producción de anticuerpos mediante los linfocitos B, la fagocitosis mediada por macrófagos, y la inducción de apoptosis mediante linfocitos T (Abbas *et al.*, 2015). Algunas citoquinas que están involucradas en estos procesos son detalladas en la Tabla 2.

**Tabla 2. Algunas citoquinas involucradas en los procesos inmunitarios.** TNF: Factor de necrosis tumoral, IFN: interferon, IL: interleuquina.

<b>Citoquina</b>	<b>Célula donde se produce</b>	<b>Efectos inmunitarios o inflamatorios</b>
TNF	Macrófagos, células dendríticas	Activación de macrófagos y neutrófilos, modificación de propiedades anticoagulantes de las células endoteliales, induce a la liberación de otras citoquinas proinflamatorias (Bazzoni & Beutler, 1996).
IFN-γ	Linfocitos T activados y NK	Regula la activación de macrófagos, refuerza el fenotipo Th1 de los linfocitos T, contribuye a la activación de linfocitos T citotóxicos específicos para virus. Es regulada por citoquinas que son secretadas por células presentadoras de antígenos, como la interleuquina-12 (IL-12) y la IL-18, y puede ser suprimida por la acción de la IL-4 e IL-10 (Schroder <i>et al.</i> , 2004).
IL-2	Linfocitos T activados	Induce la proliferación, supervivencia y diferenciación de linfocitos T, generación de linfocitos T memoria, promueve la muerte celular inducida por activación de linfocitos T (Bachmann & Oxenius, 2007).

### II.3.4 Respuesta inmune primaria y secundaria

La capacidad de la inmunidad adaptativa para generar memoria permite que, cuando se repite la infección por el mismo antígeno, la respuesta sea más rápida y eficiente. La inmunidad innata, como fue mencionado anteriormente, es la primera en actuar al momento de la exposición a un antígeno determinado, alcanza su pico a los 7 días posteriores a la infección y luego disminuye, durante esa disminución, la inmunidad adaptativa se hace presente, alcanzando su pico máximo a los 15 días posteriores a la infección, para luego disminuir en caso la infección haya sido combatida, a esto se le conoce como **respuesta inmune primaria (RIP)**. Si hay una reestimulación con el mismo antígeno, la respuesta de tipo adaptativa será más rápida y eficiente, a esto se le conoce como **respuesta inmune secundaria (RIS)** (Figura 5, Owen *et al.*, 2014).



**Figura 5. Respuesta inmune primaria y secundaria ante la infección.** Podemos observar que, ante una exposición a un antígeno A, la inmunidad innata es la primera en activarse, y la inmunidad adaptativa se da a partir de los 6 días a partir de la exposición al antígeno. Posteriormente, si al mismo individuo se le expone al mismo antígeno A, la inmunidad adaptativa actúa más rápido y de forma más eficiente que en la primera exposición (Owen *et al.*, 2014).

## **II.4. Inmunomodulación**

La inmunomodulación consiste en el uso de diversas estrategias para generar la modificación de la respuesta inmune. Para esto, se emplean diversos tipos de sustancias inmunomoduladoras, que pueden estimular o suprimir la respuesta inmune. Aquellas sustancias que potencien el sistema inmune, o inmunoadyuvantes, son empleados en enfermedades como las inmunodeficiencias, infecciones de tipo viral, bacteriano y en el tratamiento contra el cáncer (Gea-Banacloche, 2006; Martínez-Manrique, 2005).

Para modular la respuesta inmunitaria se pueden utilizar sustancias que van direccionadas a ejercer su acción sobre células del sistema inmune en presencia de un inmunógeno, lo cual hace que sean de acción específica. Entre estas se incluyen los adyuvantes y algunas vacunas terapéuticas como el bacilo de Calmette-Guérin (BCG). También pueden emplearse otros compuestos que tienen una acción inespecífica, ya que no están direccionados a actuar ante determinado antígeno, entre estos encontramos hormonas, citoquinas producidas artificialmente, y en algunos casos, glucanos y polisacáridos (Martínez-Manrique, 2005).

Actualmente se están buscando componentes que puedan ser empleados como inmunomoduladores, los cuales pueden provenir de plantas, algas, y hongos, esto con el fin de revalorarlos y extender sus usos en la industria farmacéutica, como terapias alternativas ante diversos tipos de infecciones y en el tratamiento contra el cáncer.

Los polisacáridos son un tipo de componente químico que puede ser encontrado en muchos organismos, como plantas, animales, microorganismos y algas. Son considerados como antígenos de respuesta independiente de linfocitos T, y logran producir IgM de baja afinidad. Pero se ha descrito su gran potencial inmunomodulador al presentar actividad específica por ambos tipos de linfocitos T y ante células

presentadoras de antígenos, como son los monocitos y los macrófagos (Tzianabos, 2000).

#### **II.4.1 El extracto y el fucoidan de *Lessonia trabeculata* como inmunomoduladores**

Colona-Vallejos *et al.* (2015), empleando el extracto de *Lessonia trabeculata* en cultivos de células mononucleares de sangre periférica humanas, encontró que existe incremento en la producción de ERO y NO, lo cual indica de un posible efecto inmunomodulador.

Elugo (2019) reportó que el fucoidan de *Lessonia trabeculata* no presenta efecto citotóxico sobre células mononucleares de sangre periférica humanas, además de estimular la expresión génica de las citoquinas IL-10 e IL-12p40.

Oroya (2019) también reporta que el fucoidan de *Lessonia trabeculata* estimula la producción de ERO y NO en la respuesta inmune primaria de macrófagos peritoneales de ratones previamente inmunizados con GRC, además de estimular la expresión transcripcional de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **III.1. Hipótesis**

El extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* estimula la producción de citoquinas en la respuesta inmune celular primaria y secundaria en ratones inmunizados con glóbulos rojos de carnero (GRC).

#### **III.2. Objetivo general**

Evaluar la producción de citoquinas de respuesta inmune celular primaria y secundaria en ratones BALB/c tratados con extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* e inmunizados con GRC.

#### **III.3. Objetivos específicos**

Se evaluará la respuesta inmune celular primaria y secundaria, en ratones inmunizados con GRC y tratados con extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, considerando los siguientes parámetros:

1. Producción de óxido nítrico y de especies reactivas de oxígeno en esplenocitos.
2. Expresión de ARNm de las citoquinas TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 en esplenocitos.
3. Producción de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-2 e IFN- $\gamma$  en el suero.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **IV.1. Material biológico**

#### **IV.1.1 *Lessonia trabeculata***

Las muestras de *Lessonia trabeculata* utilizadas en el estudio fueron suministradas por la empresa PSW S.A., obtenidas de la Bahía de San Nicolás, provincia de Nasca, en la región Ica (15°15'39"S, 75°13'47"W), y se identificaron taxonómicamente en el Herbario de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) "A. Weberbauer" (Anexo 10).

Las muestras fueron procesadas en los laboratorios de la empresa PSW S.A., proporcionando el extracto liofilizado; la determinación de fucoïdan fue realizada en el Departamento de Química Orgánica-CIHIDECAR, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, obteniéndose un porcentaje de 83.4% (Anexo 3). Se empleó fucoïdan de *Fucus vesiculosus* (Sigma) como control. Ambos productos serán disueltos en solución salina al 0,9% para su administración a los animales de experimentación.

#### **IV.1.2 *Mus musculus* cepa BALB/c**

Se emplearon dos grupos de 32 ratones cada uno de la cepa BALB/c en edad juvenil de aproximadamente 6 -8 semanas, adquiridos en el Instituto Nacional de Salud.

### **IV.2. Tratamiento e inmunizaciones**

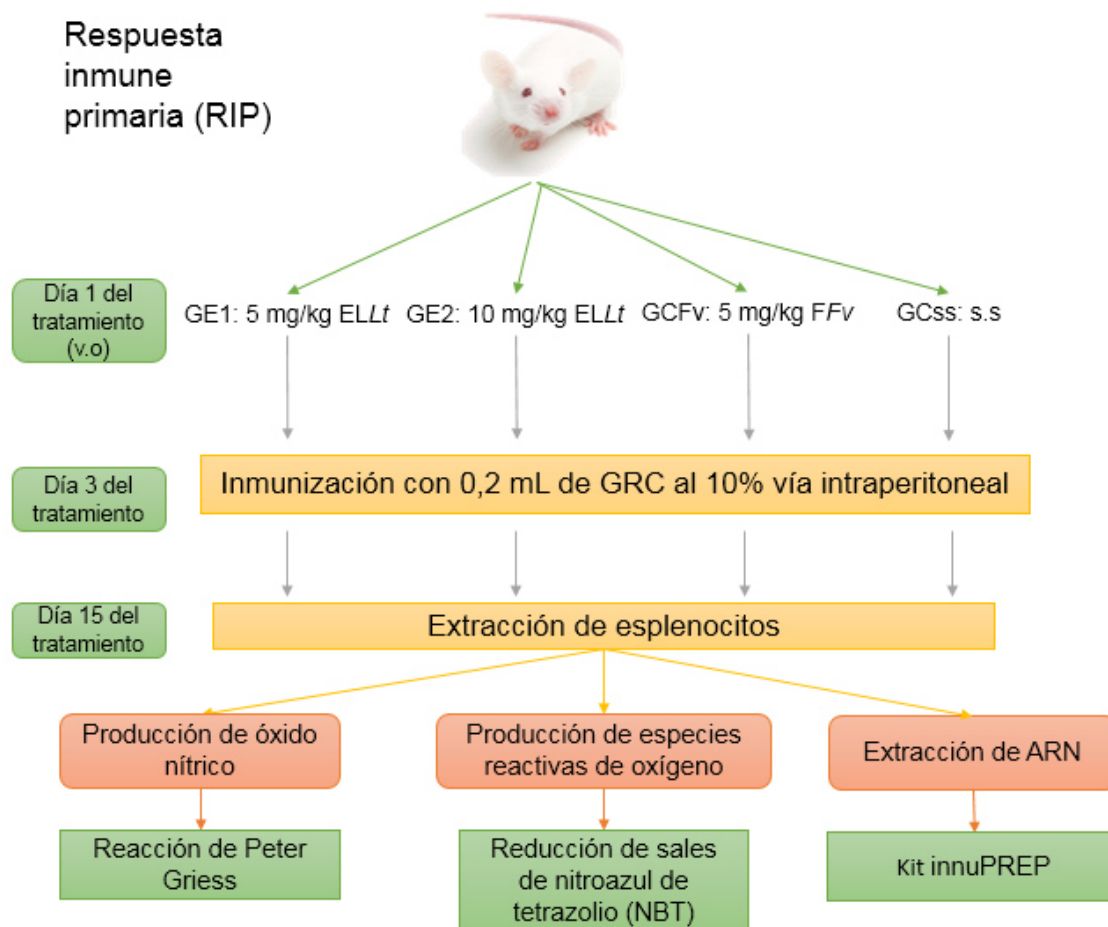
El tratamiento se realizó de acuerdo a lo descrito por Halling *et al.* (2015), con modificaciones que se detallarán a continuación, y se siguieron las pautas señaladas en la Declaración de Basilea (Basel Declaration, 2010), que regula el uso de animales de experimentación. Los ratones fueron colocados en jaulas, en forma individual, a una temperatura aproximada de 24°C, y fueron alimentados con comida balanceada

para ratón (7 g diarios), y agua hervida *ad libitum*. Fueron organizados de acuerdo a los siguientes subgrupos de tratamiento (Tabla 3).

**Tabla 3. Grupos experimentales y controles para la investigación del efecto del extracto liofilizado rico en fucoidan de *L. trabeculata* sobre la respuesta inmune celular en ratones BALB/c.** Los tratamientos han sido suministrados a cada grupo de ratones durante 15 días (para respuesta inmune primaria) o durante 30 días (para respuesta inmune secundaria). GE: Grupo experimental, GC: Grupo control.

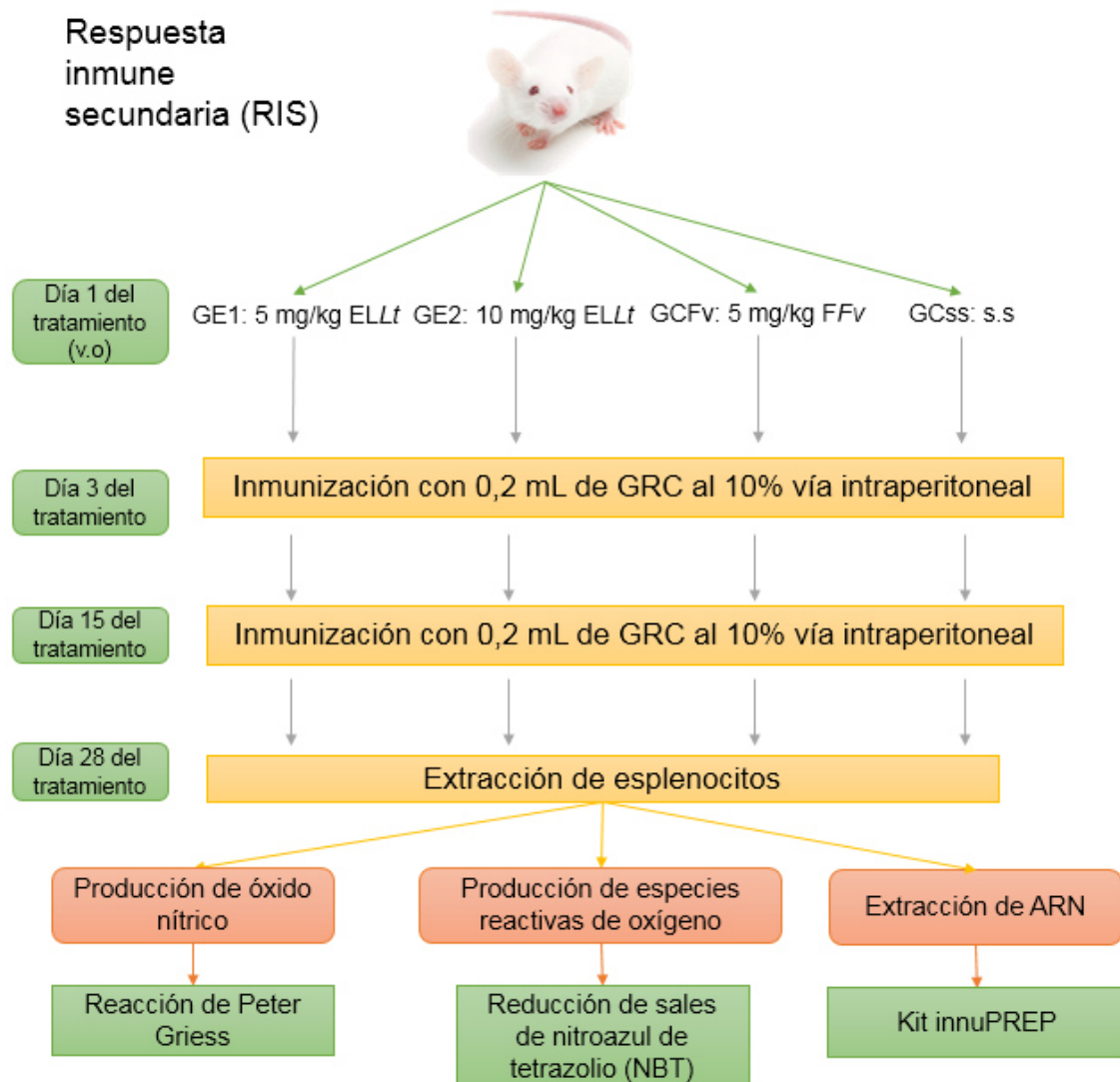
Tratamiento	Descripción
GE1	Tratados con 5 mg/kg por peso corporal (pc) de extracto liofilizado rico en fucoidan de <i>Lessonia trabeculata</i> .
GE2	Tratados con 10 mg/kg pc de extracto liofilizado rico en fucoidan de <i>Lessonia trabeculata</i> .
GCFv	Tratados con 5 mg/kg pc de fucoidan de <i>Fucus vesiculosus</i> (Sigma) como control de fucoidan.
GCss	Sin tratamiento: solución salina al 0.9%.

Cada subgrupo tuvo el mismo número de individuos (n=8). La administración de cada tratamiento fue por vía oral, diariamente excepto los días domingos. Luego de tres días de tratamiento, se les inmunizó con 0,2 mL de glóbulos rojos de carnero (GRC) al 10% vía intraperitoneal (ip). De acuerdo al tipo de respuesta a evaluar, un grupo fue tratado por 13 días (respuesta inmune primaria, RIP), y el otro grupo por 25 días, con una segunda inmunización ip en el día 15 del tratamiento (respuesta inmune secundaria, RIS). Posterior a las inmunizaciones, se siguió administrando el tratamiento por vía oral. Al final del tratamiento, se realizó el sacrificio de los ratones por dislocación cervical, y se extrajo el bazo de cada uno de ellos en condiciones de esterilidad. Las Figuras 6 y 7 muestran los flujogramas de trabajo.



**Figura 6. Flujograma de trabajo para respuesta inmune primaria (RIP).** Se detalla cada tratamiento, la inmunización con glóbulos rojos de carnero al 10% al día 3 del tratamiento, la extracción de esplenocitos al día 15 del tratamiento, y el posterior uso de los esplenocitos en los ensayos de producción de óxido nítrico mediante la reacción de Peter Griess, la producción de especies reactivas de oxígeno mediante la reducción de sales de nitroazul de tetrazolio (NBT), y la extracción de ARN mediante el kit innuPREP. ELLt: Extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, FFv: Fucoïdan de *Fucus vesiculosus*. GE1: 5 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, GE2: 10 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, GCFv: 5 mg/kg de fucoïdan de *Fucus vesiculosus*, GCss: control negativo.

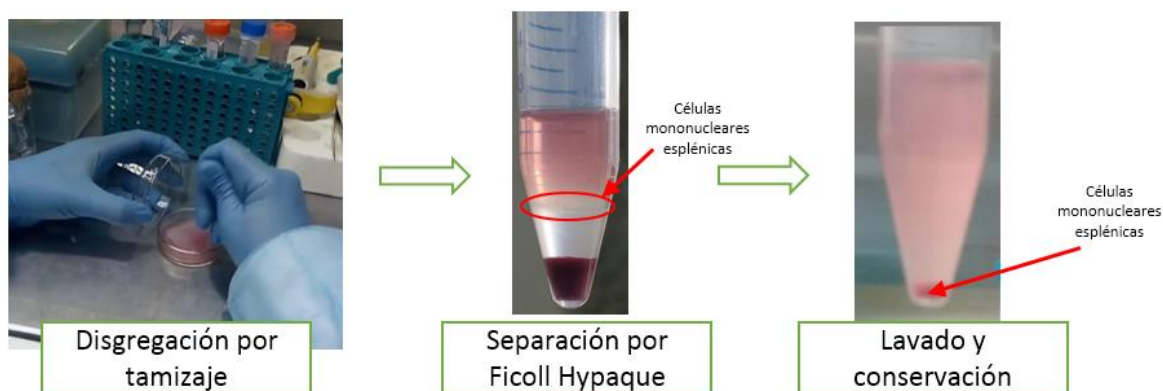




**Figura 7. Flujograma de trabajo para respuesta inmune secundaria (RIS).** Se detalla cada tratamiento, la primera inmunización con glóbulos rojos de carnero al 10% el día 3 del tratamiento, la segunda inmunización con glóbulos rojos de carnero al 10% el día 15 del tratamiento, y la obtención de esplenocitos el día 28 del tratamiento para los ensayos de producción de óxido nítrico mediante la reacción de Peter Griess, la producción de especies reactivas de oxígeno mediante la reducción de sales de nitroazul de tetrazolio (NBT), y la extracción de ARN mediante el kit innuPREP. ELLt: Extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, FFv: Fucoidan de *Fucus vesiculosus*. GE1: 5 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GE2: 10 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GCFv: 5 mg/kg de fucoidan de *Fucus vesiculosus*, GCss: control negativo.

#### IV.3 Extracción de células del bazo de ratones inmunizados

El proceso de extracción de esplenocitos se detalla en la Figura 8. Se separaron las células realizando una disgregación por tamizado del bazo con medio RPMI-1640 (Anexo 4), 1.5 mL de la suspensión obtenida fue colocada en un tubo de centrifuga que contenía 0.75 mL de Ficoll Hypaque para realizar una separación por gradiente de densidad, y fueron centrifugadas a 1520 rpm por 25 minutos. Las células esplénicas, que se podían observar en un anillo entre el plasma y el Ficoll, fueron separadas en un tubo de centrifuga y lavadas para eliminar rastros del Ficoll Hypaque. Finalmente fueron conservadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (RPMI-SBF) (Anexo 3) para su uso en los siguientes ensayos.



**Figura 8. Obtención de esplenocitos de ratones inmunizados.** Se realizó primero una disgregación del bazo por medio de un tamiz, en medio de cultivo RPMI-1640. Posteriormente, se colocó la suspensión celular en un tubo de centrifuga conteniendo Ficoll Hypaque, y se centrifugó por 25 minutos a 1520 rpm, con el fin de obtener un anillo de células mononucleares esplénicas. Luego, se realizó un lavado con RPMI-1640 y se conservó en RPMI-SBF para su uso en los demás ensayos.

#### IV.4 Obtención del suero de ratones inmunizados

La Figura 9 detalla la forma de la obtención del suero de los ratones. Para la obtención de suero, los ratones fueron sangrados *post-mortem*, mediante punción cardiaca directa evitando hemólisis. La sangre fue colocada en *microtainers* con gel de polímeros separador de suero y colocada en frío mínimamente por 30 min a 4°C. Las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm por 10 min. Los sueros fueron traspasados

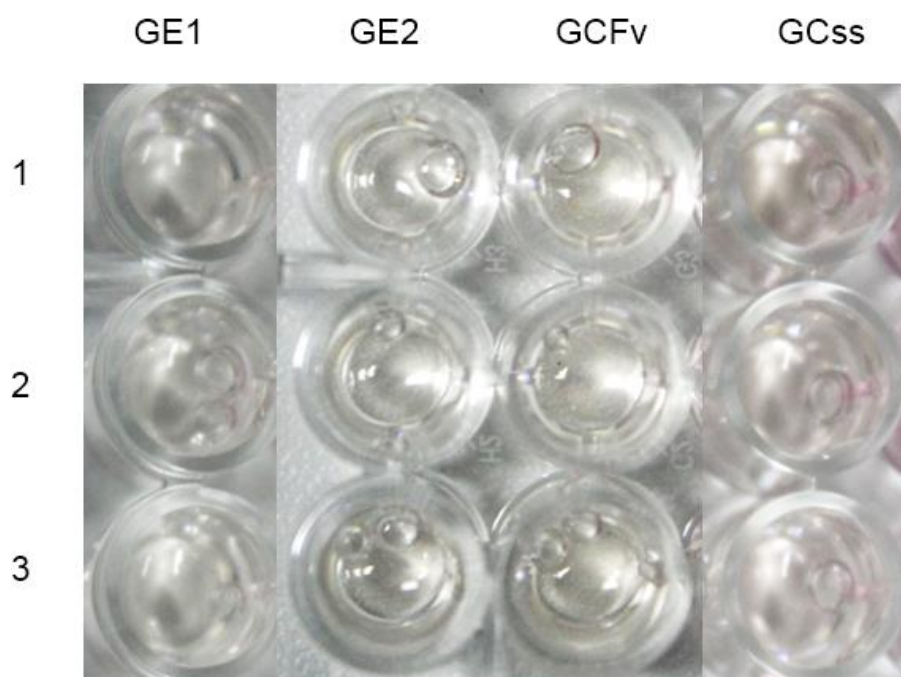
a microtubos. Para evaluar las citoquinas presentes, se realizó un pool de tres muestras de suero, aleatorias por grupo, las cuales se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su uso.



**Figura 9. Obtención de suero de ratones inmunizados.** Se realizó la sangría *post-mortem* por punción cardíaca, obteniéndose aproximadamente 1 mL de sangre por cada ratón. Luego, se procedió a colocar la sangre en *microtainers*, y se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos para la obtención del suero. Este fue recolectado en microtubos de 2 mL y conservado a -80°C hasta su uso.

#### **IV.5 Evaluación de la producción de óxido nítrico (NO) mediante la reacción de Griess**

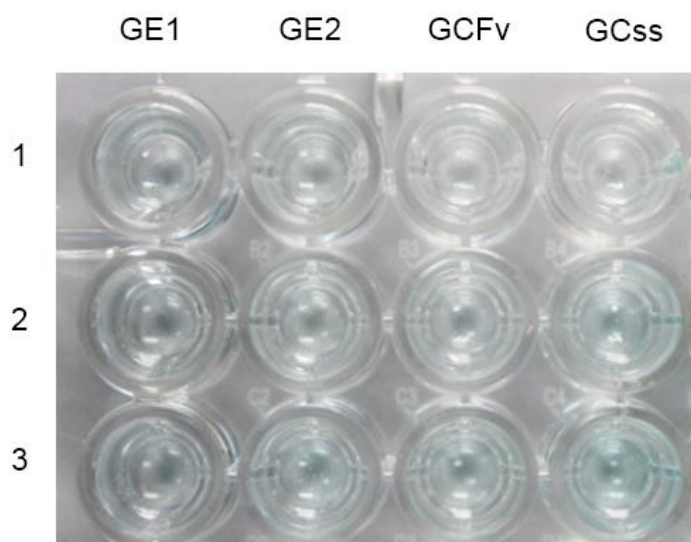
Para realizar la evaluación de la producción de NO en las células esplénicas, se empleó el kit Griess Reagent System (Promega). Las células esplénicas se colocaron en microplacas de 96 pocillos y se realizó un cultivo de 48 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, posteriormente, se les añadió 50 µL de solución de sulfanilamida, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y protegido de la luz, se les colocó 50 µL de solución de NED, se incubó 30 min a las mismas condiciones, luego se realizó la medición de absorbancia a 492 nm. Previamente, se realizó una curva de calibración empleando nitrito que está incluida en el kit (Anexo 5). La disposición de los cultivos para la evaluación del nivel de óxido nítrico se observa en la Figura 10.



**Figura 10. Evaluación de la producción de óxido nítrico en cultivo de esplenocitos.** Se observa la distribución de los cultivos de acuerdo a los tratamientos realizados. Se determinó escasa producción de óxido nítrico en todos los tratamientos. GE1: 5 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GE2: 10 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GCFv: 5 mg/kg de fucoidan de *Fucus vesiculosus*, GCss: control negativo.

#### **IV.6 Evaluación de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) mediante la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT)**

Las células esplénicas fueron cultivadas en microplacas de 96 pocillos por 2 h. Luego de dos lavados con buffer fosfato salino, se agregó el nitroazul de tetrazolio en una concentración de 0.5% diluido en medio RPMI-SBF (Anexo 6), y se incubó por una hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se realizaron dos lavados con buffer fosfato salino, se fijaron las células con metanol puro, y se añadió hidróxido de potasio (KOH) a 2M y dimetilsulfóxido (DMSO), y luego de 10 min se realizó la lectura a 630 nm. La distribución de los cultivos para la evaluación de producción de ROS se observa en la Figura 11.

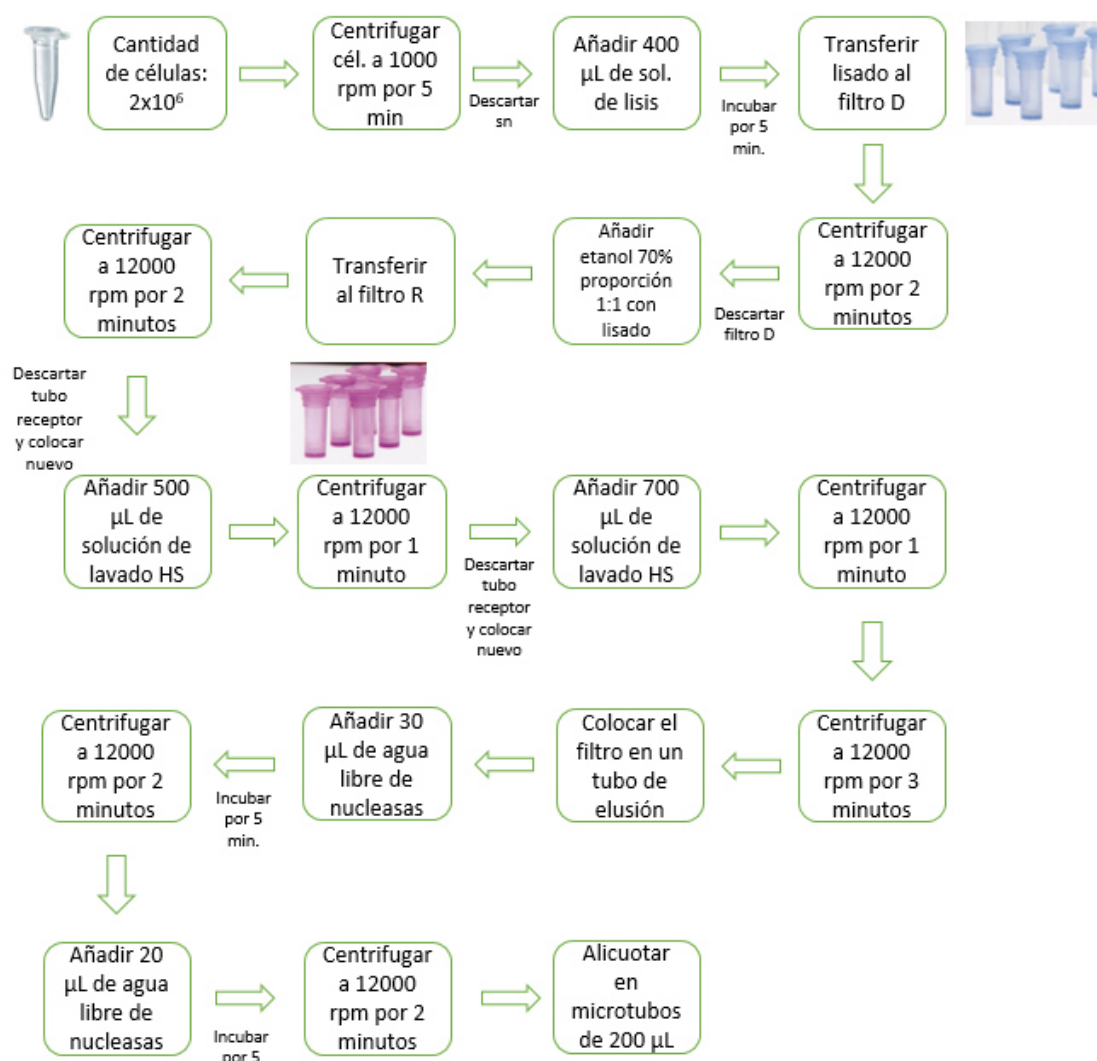


**Figura 11. Evaluación de la producción de ERO mediante el reactivo NBT en cultivos de esplenocitos.** Se observa la distribución de cada grupo de tratamiento. Se tiene que hay una cantidad muy baja de NBT reducido en cada uno de los tratamientos. GE1: 5 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GE2: 10 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GCFv: 5 mg/kg de fucoidan de *Fucus vesiculosus*, GCss: control negativo.

#### **IV.7 Evaluación de la expresión de ARNm para las citoquinas TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-2 e IFN- $\gamma$ en ratones inmunizados**

##### **IV.7.1 Extracción de ARN total**

Para la obtención de ARNm, se empleó el kit de extracción de ARN innuPREP RNA Mini (AnalytikJena), utilizando  $2 \times 10^6$  células esplénicas, siguiendo las indicaciones del fabricante (Figura 12). Se realizó una cuantificación del ARN total obtenido mediante el método fluorométrico Qubit 3.0 (ThermoScientific).



**Figura 12. Flujograma de extracción de ARN mediante el kit innuPREP RNA Mini (AnalytikJena).** Se detalla el procedimiento realizado para la extracción de ARN de esplenocitos.

#### IV.7.2 Síntesis de ADNc (RT-PCR)

Se hizo la retrotranscripción a ADNc mediante RT-PCR, empleando el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis (ThermoScientific), siguiendo el protocolo empleado por Oroya (2019), a fin de poder realizar la cuantificación de la expresión. La reacción de retrotranscripción fue realizada utilizando un termociclador, de acuerdo a lo indicado en la Tabla 4.

**Tabla 4. Reacción de retrotranscripción de ARN a ADNc mediante el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis (ThermoScientific).** Las temperaturas y los tiempos están determinadas por el kit.

<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Extensión inicial	25°C	10 min
Síntesis de ADNc	50°C	15 min
Finalización de la reacción	85°C	5 min
Enfriado	4°C	Indefinido

#### **IV.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional**

Para poder visualizar las diferencias en expresión de las citoquinas TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-2 e IFN- $\gamma$ , además de un control interno de expresión (GAPDH), se realizó la amplificación por PCR para estos genes, empleando el kit Platinum PCR Supermix (Invitrogen), siguiendo el protocolo empleado por Oroya (2019), empleando 1  $\mu$ L de muestra de ADNc a una concentración de 0,5 ng/ $\mu$ L, y usando primers específicos para cada uno de los genes (Anexo 7). Las reacciones fueron realizadas empleando un termociclador (Figura 13), usándose los pasos descritos en la Tabla 5.



**Tabla 5. Ciclos del PCR empleado para la detección de citoquinas.** El tiempo para la extensión fue ajustado de acuerdo al tamaño del amplicón (determinado por el kit: 1 min por kilobase), y las temperaturas de hibridación y el número de ciclos están basados en los reportes de cada primer.

			Citoquinas			
Pasos	Ciclos		TNF-α	TNF-β	IFN-γ	IL-2
Denaturación inicial	1	Temperatura	94°C			
		Tiempo	5 min			
Denaturación	35	Temperatura	94°C			
		Tiempo	30 s			
Temperatura		60°C	56°C	60°C	60°C	
Tiempo		30 s				
Extensión		Temperatura	72°C			
		Tiempo	30 s			
Extensión final	1	Temperatura	72°C			
		Tiempo	7 min			

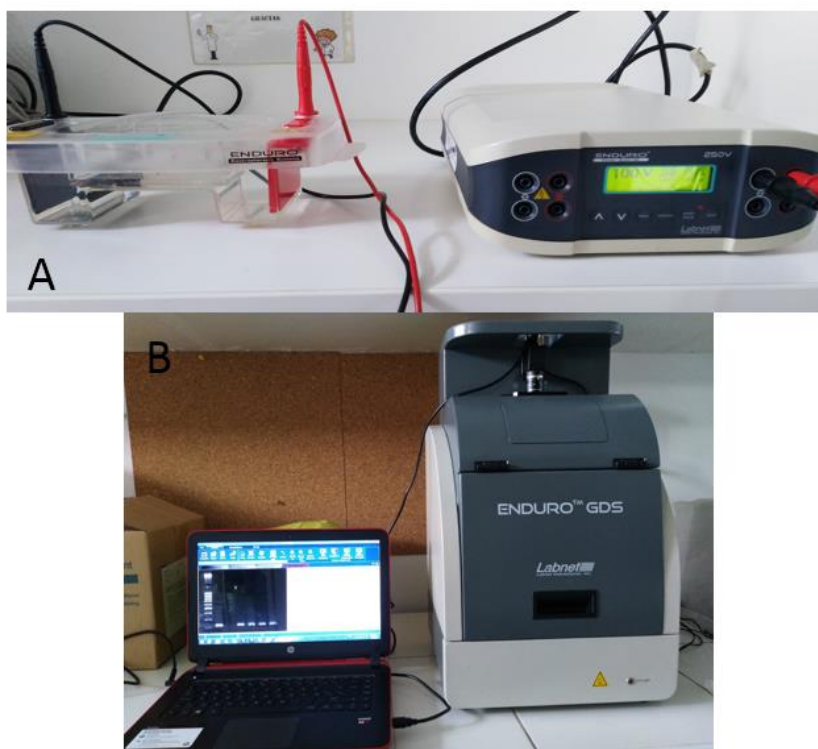


**Figura 13. PCR convencional.** Se observa el termociclador programado para realizar el PCR convencional. Se puede ver el ciclo que va a realizar.



#### IV.7.4 Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar lo obtenido mediante PCR se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1,7% para los amplicones de TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-2 y GAPDH, y al 2% para los amplicones de IFN- $\gamma$ , empleando buffer Tris-Borato-EDTA 1X (Anexo 8), se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 100bp Plus (ThermoScientific), y el gel stainer SYBR Safe DNA (Invitrogen) para poder observar las bandas obtenidas. La corrida se efectuó a 100 V por 55 minutos en una cámara horizontal (Figura 14A), luego de la cual se pasó a visualizar el gel y tomar fotografías en un fotodocumentador Enduro (Figura 14B).



**Figura 14. Corrida electroforética.** A. Equipo empleado para la electroforesis en gel de agarosa. B. Fotodocumentador Enduro, y el software incluido en el equipo, para la captura de imágenes de los geles a analizar.

#### IV.7.5 Análisis por cuantificación densiométrica

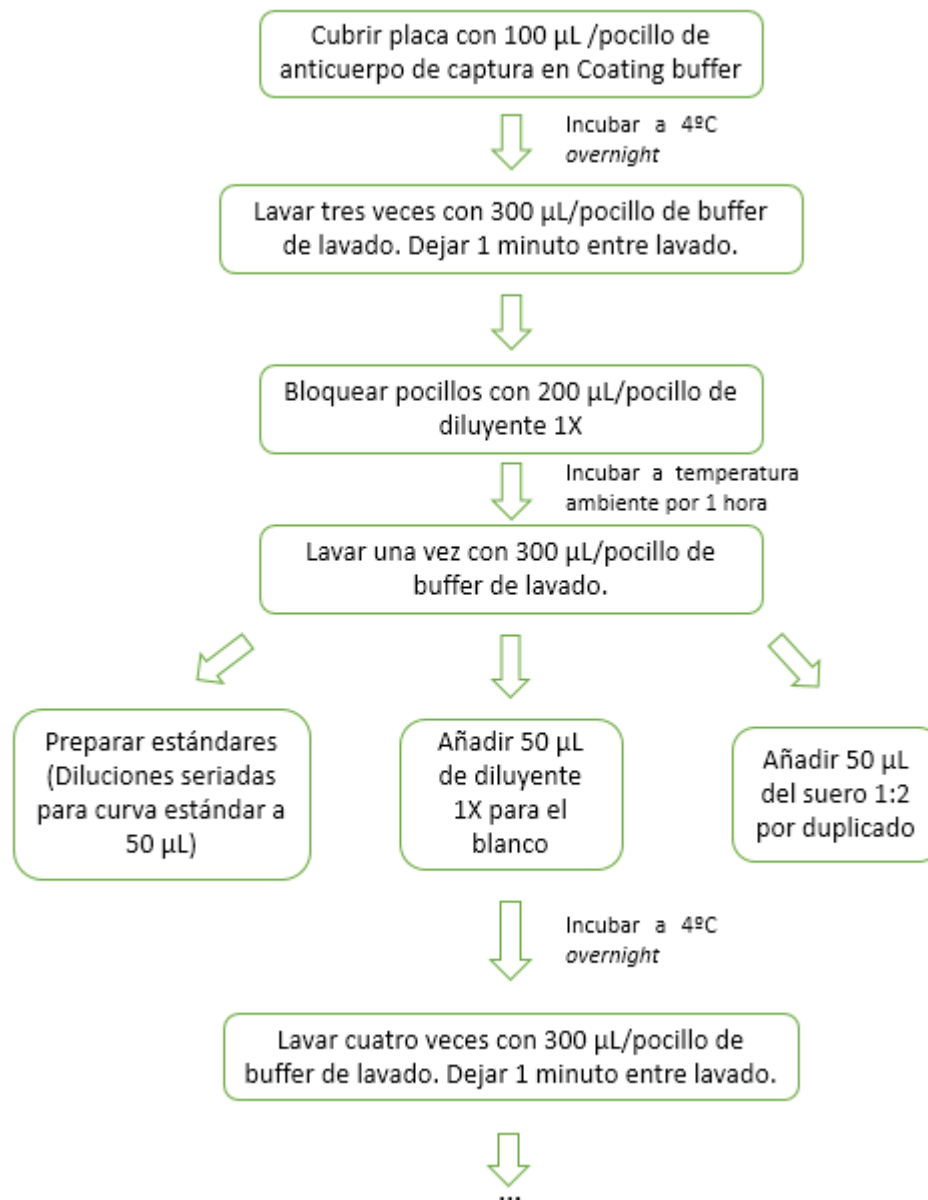
Se empleó el software ImageJ v. 1.52a (National Institute of Health, USA), utilizando para el análisis las fotografías tomadas anteriormente con el fotodocumentador. Se

halló la relación entre la densidad de las bandas de ARNm de cada citoquina y la densidad de las bandas del gen constitutivo GAPDH, para cada tratamiento y para el control.

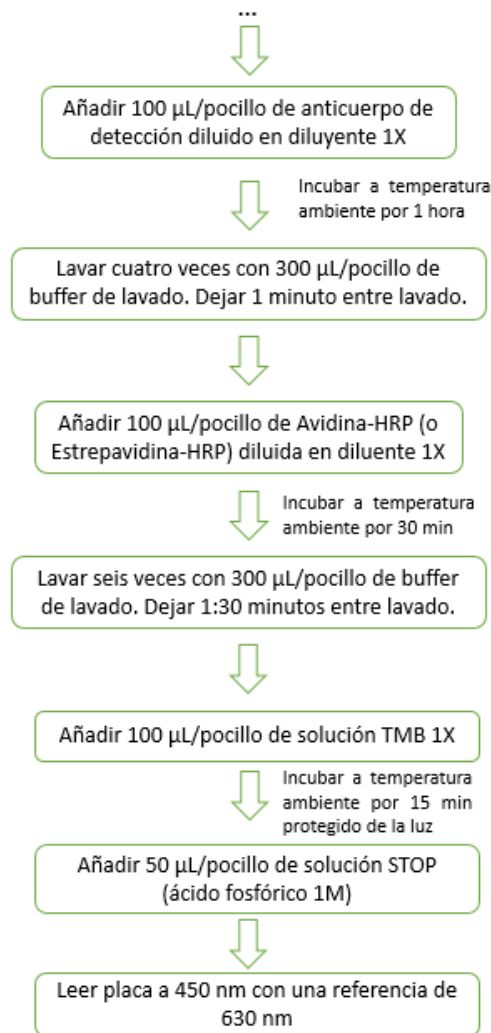
#### **IV.8 Evaluación de la producción de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e IL-2 en suero de ratones inmunizados**

Para evaluar la cantidad de citoquinas presentes en el suero de ratones inmunizados, se empleó el ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) de tipo sándwich, específico para cada citoquina a detectar (Invitrogen).

Primero, se fijaron los anticuerpos de captura en microplacas de 96 pocillos, incubándolos a 4°C *overnight*, para luego colocar 50  $\mu$ L de suero a la dilución 1:2, por duplicado. Además, se realizaron curvas estándar para cada una de las citoquinas, empleando, por cada kit, diferente concentración inicial (Anexo 9A, B y C). Después de incubar a 4°C *overnight* y un posterior lavado, se colocó el anticuerpo de detección conjugado con biotina, se empleó la enzima avidina (o estreptavidina) conjugada con peroxidasa (HRP) para detectar el segundo anticuerpo, y se utilizó tetrametilbencidina (TMB) como cromógeno, el cual reacciona con la peroxidasa y le da una coloración turquesa en presencia del conjugado. Se empleó una solución de ácido fosfórico 1M para detener la reacción y para su posterior lectura en un espectrofotómetro a 450 nm, con una referencia de 630 nm. El protocolo empleado para los ELISAs se presenta en la Figura 15.



**Figura 15.** Protocolo empleado para ELISA sándwich en la cuantificación de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2.



**Figura 15. (Continuación) Protocolo empleado para ELISA sándwich en la cuantificación de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2.** El kit para la detección de IL-2 utiliza la enzima estreptavidina para detectar el anticuerpo de detección, y los kits para la detección de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  emplean avidina.

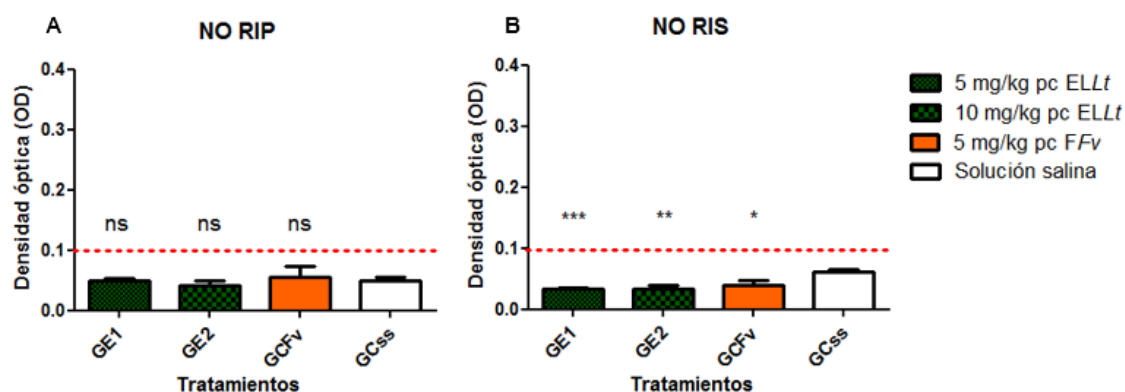
#### IV.9 Análisis estadístico

Se realizó utilizando el software GraphPad Prism v. 5.00 (GraphPad Software Inc, 2007). Para los resultados obtenidos de la producción de ERO, NO y la cantidad de citoquinas en suero se empleó *t student* de dos colas, que permite evaluar cada grupo de tratamiento frente a un control, y para los resultados obtenidos de la expresión génica de citoquinas en esplenocitos, se utilizó ANOVA de una sola vía, con un posterior *test* de comparaciones múltiples de Tukey, que permite hacer comparaciones entre todos los grupos. Se estableció un p-value menor a 0.05 para que las diferencias sean significativas.

## V. RESULTADOS

### V.1 Evaluación de la producción de óxido nítrico (NO) y de especies reactivas de oxígeno (ROS) de ratones inmunizados

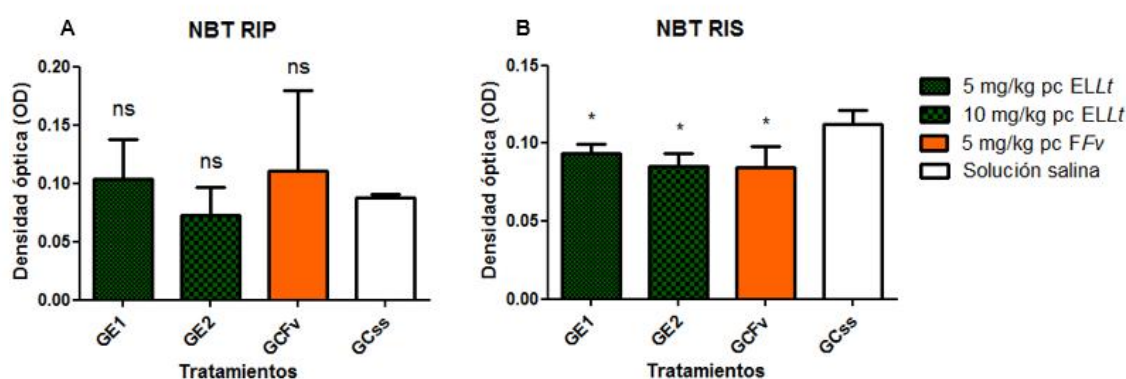
Se presentan los valores de densidad óptica por cada tratamiento. Se tiene que, para respuesta inmune primaria, los valores no presentan diferencias significativas entre los tratamientos y tampoco respecto al control (Figura 16 A). En el caso de respuesta inmune secundaria se presentó disminución significativa entre cada tratamiento y también respecto al control, sin embargo, no se puede determinar si realmente el extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* influye en la producción de óxido nítrico por parte de los esplenocitos (Figura 16 B).



**Figura 16. Evaluación de la producción de óxido nítrico (NO) en esplenocitos mediante la reacción de Peter Griess.** Las barras representan la media + desviación estándar. Los valores para ambos tipos de respuesta son menores que el mínimo detectable por el kit (0.056  $\mu$ M). A. Para RIP se tiene que las diferencias de cada tratamiento con el control (GCss) no son significativas. B. Para RIS se presentan diferencias significativas de cada tratamiento con GCss, sin embargo, entre cada tratamiento no hay diferencias significativas. ELLt: Extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, FFv: Fucoidan de *Fucus vesiculosus*. GE1: 5 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GE2: 10 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GCFv: 5 mg/kg de fucoidan de *Fucus vesiculosus*, GCss: control negativo. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ .

La reducción de nitroazul de tetrazolio, cuantificado por la densidad óptica, es representada en la Figura 17. Para RIP (A), los tratamientos que emplean 5 mg/kg pc de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* y fucoidan de *Fucus vesiculosus*, presentan mayor reducción que el grupo control, sin embargo, la

diferencia no es significativa ( $p>0.05$ ), y el grupo tratado con 10 mg/kg pc de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* disminuyó comparado con el grupo control, aunque esta diferencia no es significativa ( $p>0.05$ ). Las diferencias entre cada grupo tratado tampoco son significativas. Para RIS (B), los grupos tratados disminuyeron comparados con el grupo control ( $p<0.05$ ), sin embargo, las diferencias entre grupos no son significativas ( $p>0.05$ ).



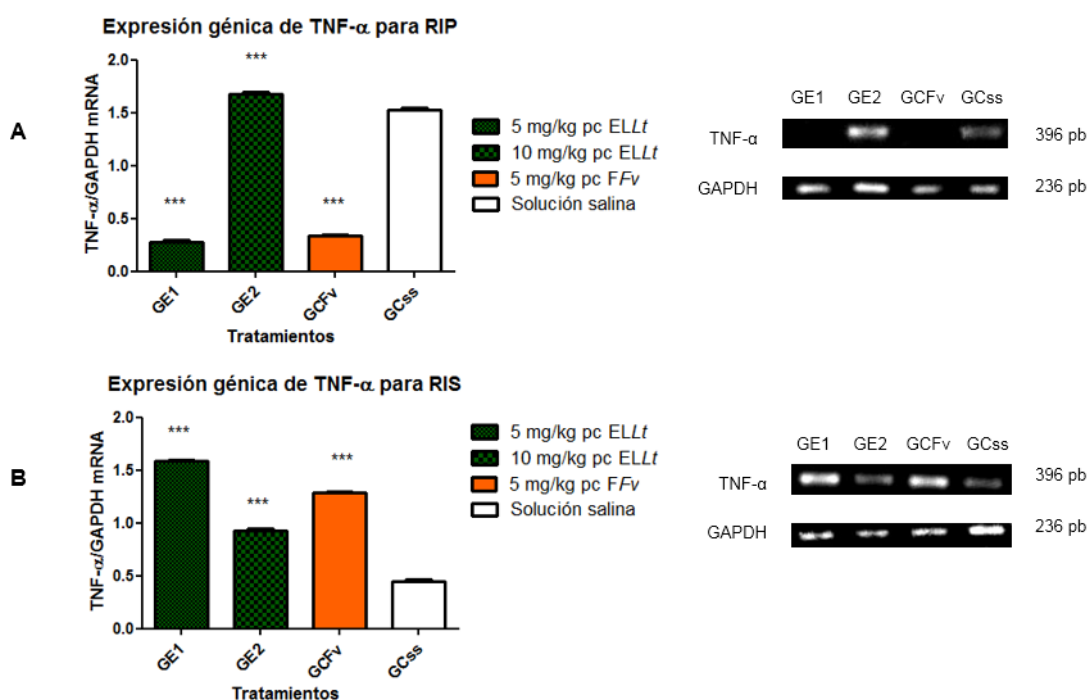
**Figura 17. Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en esplenocitos empleando el reactivo nitroazul de tetrazolio (NBT).** A. Para RIP, no existen diferencias significativas entre los esplenocitos obtenidos de ratones tratados con extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* y los esplenocitos de ratones control (GCss). B. Para RIS, existen diferencias significativas entre los esplenocitos de ratones tratados y los esplenocitos de ratones control. ELLt: Extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, FFv: Fucoidan de *Fucus vesiculosus*. GE1: 5 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GE2: 10 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GCFv: 5 mg/kg de fucoidan de *Fucus vesiculosus*, GCss: control negativo. \*:  $p<0.05$ .

## V.2 Evaluación de la expresión de ARNm para las citoquinas TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ e IL-2 en ratones inmunizados

**La expresión de ARNm de TNF- $\alpha$**  en esplenocitos provenientes de ratones inmunizados y tratados con extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* y fucoidan de *Fucus vesiculosus* se ve en la Figura 18. Para RIP (A) la expresión de TNF- $\alpha$  aumenta significativamente ( $p<0.001$ ) al comparar los esplenocitos de ratones control y esplenocitos de ratones tratados con 10 mg/kg pc de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*. Caso contrario, la expresión disminuye significativamente ( $p<0.001$ ) en el grupo tratado con 5 mg/kg pc de extracto liofilizado

rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, la cual también disminuye significativamente ( $p<0.05$ ) frente al grupo tratado con 5 mg/kg pc de fucoidan de *Fucus vesiculosus*.

Para RIS (B), se observa que la expresión de TNF- $\alpha$  aumenta significativamente ( $p<0.001$ ) en todos los tratamientos, respecto al grupo control. También se ve el incremento significativo ( $p<0.001$ ) del grupo tratado con 5 mg/kg pc de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* frente a los demás grupos.



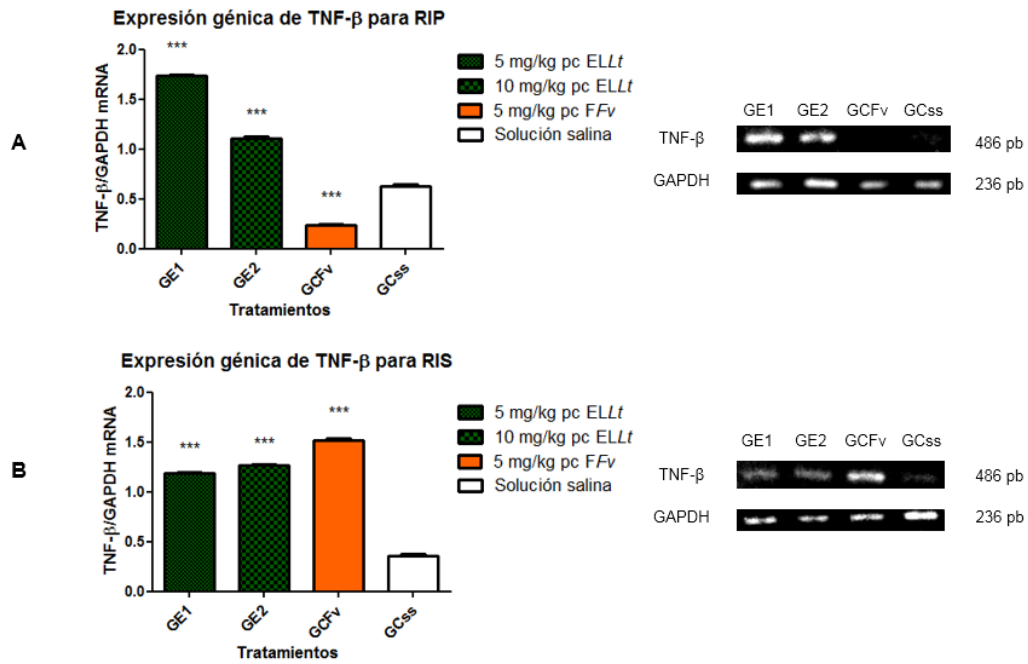
**Figura 18. Evaluación de la expresión génica de TNF- $\alpha$  en esplenocitos.** A. Para RIP, se tiene que hay incremento significativo entre los esplenocitos de ratones tratados con 10 mg/kg pc de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* y los esplenocitos de ratones control (GCss), también se observa incremento significativo entre las dos concentraciones del extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*. B. Para RIS, se tiene incremento significativo de la expresión entre los esplenocitos de ratones tratados con 5 mg/kg pc del extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* y los esplenocitos de ratones control (Gcss), y la disminución significativa entre las dos concentraciones del extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*. ELLt: Extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, FFv: Fucoidan de *Fucus vesiculosus*. GE1: 5 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GE2: 10 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GCFv: 5 mg/kg de fucoidan de *Fucus vesiculosus*, GCss: control negativo. \*\*\*:  $p<0.001$ .

**La expresión de ARNm de TNF- $\beta$  en esplenocitos** provenientes de ratones inmunizados y tratados con extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* y fucoidan de *Fucus vesiculosus* se presenta en la Figura 19. Para RIP (A) se tiene

que, para los esplenocitos de ratones tratados con extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, hay incremento significativo ( $p<0.001$ ) respecto al control, mientras que el grupo tratado con fucoïdan de *Fucus vesiculosus* disminuye significativamente ( $p<0.001$ ) con respecto al control, además de la disminución significativa ( $p<0.001$ ) del grupo tratado con 10 mg/kg pc del extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata* con respecto al grupo tratado con 5 mg/kg pc del extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*.

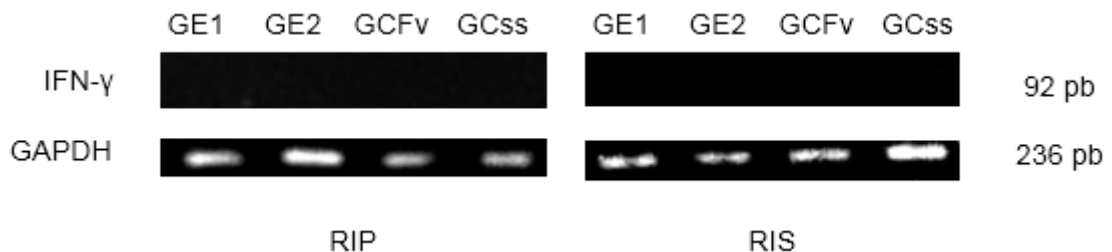
Para RIS (B) se tiene el aumento significativo ( $p<0.001$ ) de los grupos tratados con extracto o con fucoïdan, con respecto al control. Se ve que, en caso de los grupos tratados con extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, existe incremento significativo ( $p<0.05$ ) en el grupo tratado con 10 mg/kg pc sobre el grupo tratado con 5 mg/kg pc. El fucoïdan de *Fucus vesiculosus* aumentó significativamente ( $p<0.001$ ) la expresión de TNF- $\beta$  comparado con el extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*.





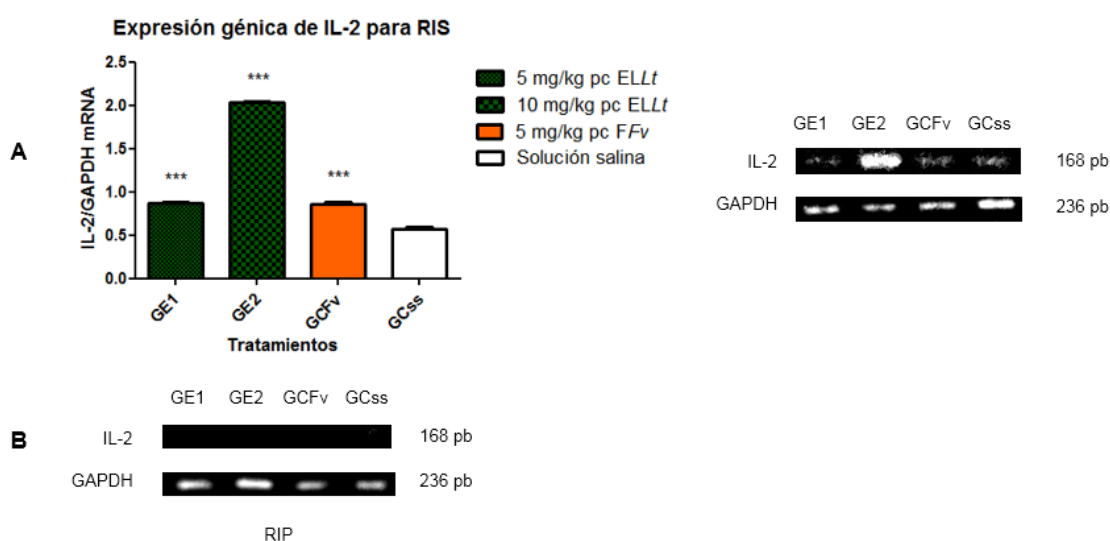
**Figura 19. Evaluación de la expresión génica de TNF- $\beta$  en esplenocitos.** A. Para RIP, se tiene que la expresión génica se incrementó significativamente en los grupos tratados con extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* respecto al GCss, y también se encuentra el incremento significativo de la expresión en esplenocitos de ratones tratados con 5 mg/kg pc de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, comparado con el grupo tratado con 10 mg/kg pc de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*. B. Para RIS, se observa el incremento significativo entre los grupos tratados con extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* y el grupo control. ELLt: Extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, FFv: Fucoidan de *Fucus vesiculosus*. GE1: 5 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GE2: 10 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GCFv: 5 mg/kg de fucoidan de *Fucus vesiculosus*, GCss: control negativo. \*\*\*:  $p < 0.001$ .

**La expresión de ARNm de IFN- $\gamma$  en esplenocitos** provenientes de ratones inmunizados y tratados se observa en la Figura 20. Se ve que, en RIP y RIS, no hay expresión de IFN- $\gamma$  en ninguno de los grupos.



**Figura 20. Evaluación de la expresión génica de IFN- $\gamma$  en esplenocitos.** En ambas respuestas (RIP y RIS) no se observa la expresión de IFN- $\gamma$ . GE1: 5 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GE2: 10 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GCFv: 5 mg/kg de fucoidan de *Fucus vesiculosus*, GCss: control negativo.

**La expresión de ARNm de IL-2** en esplenocitos provenientes de ratones inmunizados y tratados con extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* y fucoidan de *Fucus vesiculosus* se observa en la Figura 21. Para RIP (B) se observa que no hay expresión de IL-2 en ninguno de los grupos. En cambio, para RIS (A) se tiene que hay incremento significativo ( $p<0.001$ ) entre los grupos tratados con el extracto, con el fucoidan y el control. En el caso de los grupos tratados con extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, se ve el aumento significativo ( $p<0.001$ ) entre el grupo tratado con 10 mg/kg pc sobre el grupo tratado con 5 mg/kg pc, además, el grupo tratado con 10 mg/kg pc también presenta incremento significativo ( $p<0.001$ ) sobre el grupo tratado con fucoidan de *Fucus vesiculosus*. Pero, al comparar el grupo tratado con 5 mg/kg pc del extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* y el grupo tratado con fucoidan de *Fucus vesiculosus*, se observa que no hay diferencias significativas ( $p>0.05$ ).

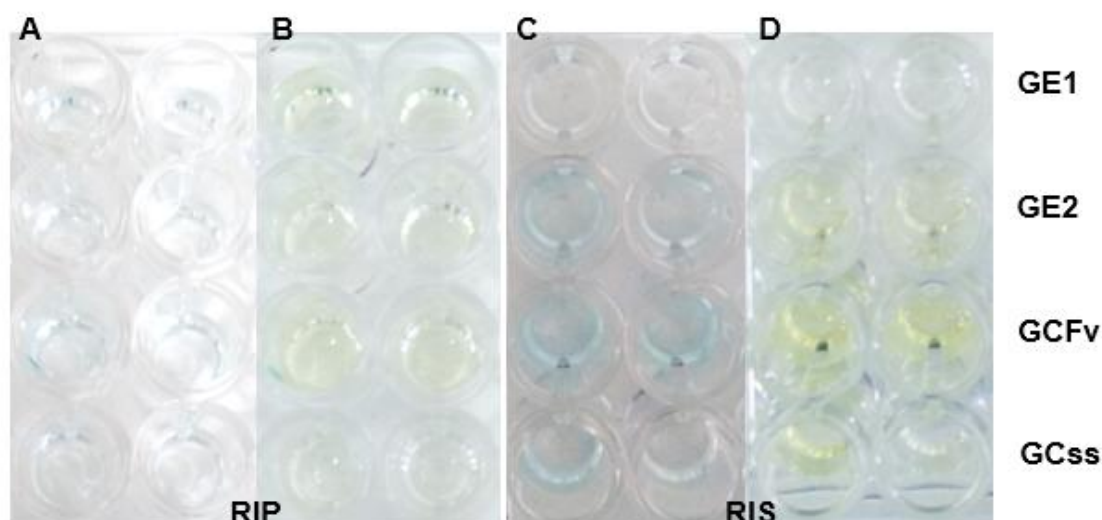


**Figura 21. Evaluación de la expresión génica de IL-2 en esplenocitos.** A. Para RIS se tiene incremento significativo entre los grupos tratados con extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* y el grupo control (GCss). También se observa el incremento significativo entre ambos grupos tratados con extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*. B. Para RIP no se encontró expresión de IL-2 en ninguno de los grupos. ELLt: Extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, FFv: Fucoidan de *Fucus vesiculosus*. GE1: 5 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GE2: 10 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GCFv: 5 mg/kg de fucoidan de *Fucus vesiculosus*, GCss: control negativo. \*\*\*:  $p<0.001$ .

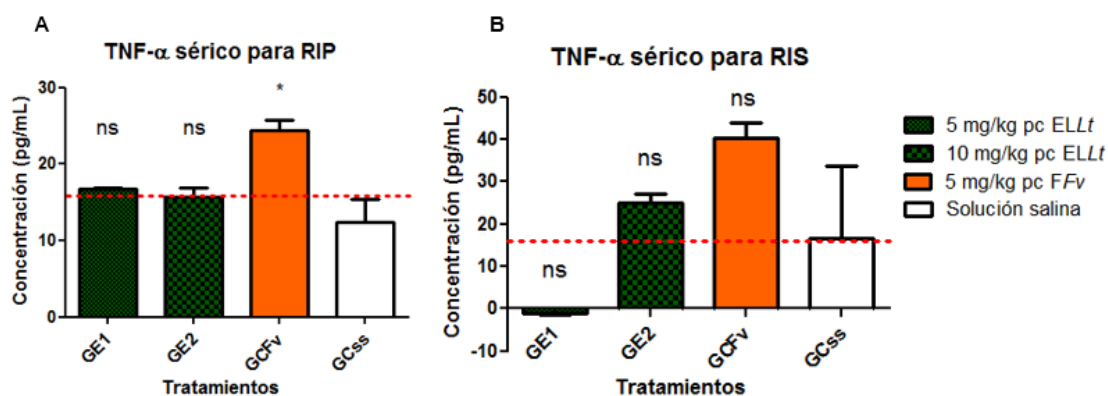
### V.3 Evaluación de la producción de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e IL-2 en suero de ratones inmunizados

La producción de TNF- $\alpha$  fue medida realizando un ELISA tipo sándwich a partir de una curva estándar elaborada con TNF- $\alpha$  liofilizado de ratón (Anexo 9A). Se ve en la Figura 23 la concentración de TNF- $\alpha$  presente en el suero de ratones inmunizados y tratados con fucoidan. Para RIP (A) se observa que la concentración de TNF- $\alpha$  de los grupos tratados con extracto o con fucoidan es mayor a la del grupo control, sin embargo, esta diferencia no es significativa ( $p>0.05$ ), salvo para el grupo tratado con fucoidan de *Fucus vesiculosus* ( $p<0.05$ ). Para los grupos tratados con extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, se tiene que la diferencia entre ellos no es significativa ( $p>0.05$ ).

Para RIS (B) se observa que hay mayor concentración de TNF- $\alpha$  en el grupo tratado con 10 mg/kg pc de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* y en el grupo tratado con fucoidan de *Fucus vesiculosus*, sin embargo, esta diferencia no es significativa ( $p>0.05$ ). Se ve también que hay mayor concentración de TNF- $\alpha$  en el grupo tratado con fucoidan de *Fucus vesiculosus*, comparado con el grupo tratado con extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, sin embargo, la diferencia no es significativa ( $p>0.05$ ).



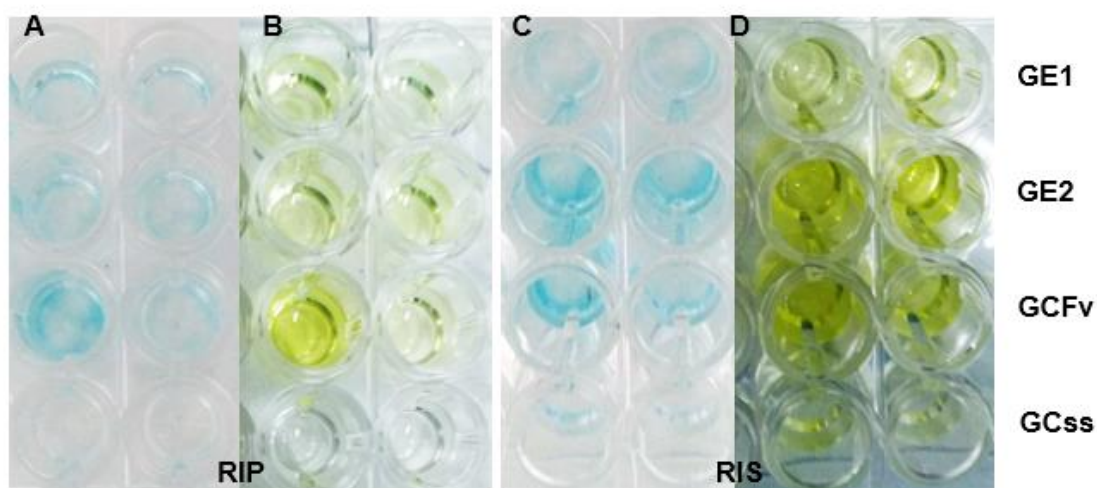
**Figura 22. Evaluación de la producción de TNF- $\alpha$  en suero mediante ELISA.** En A y C se observan los pocillos a los que se han agregado el cromógeno TMB 1X, y en B y D se observan los pocillos luego de agregarse la solución STOP (ácido fosfórico 1M). GE1: 5 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, GE2: 10 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, GCFv: 5 mg/kg de fucoïdan de *Fucus vesiculosus*, GCss: control negativo.



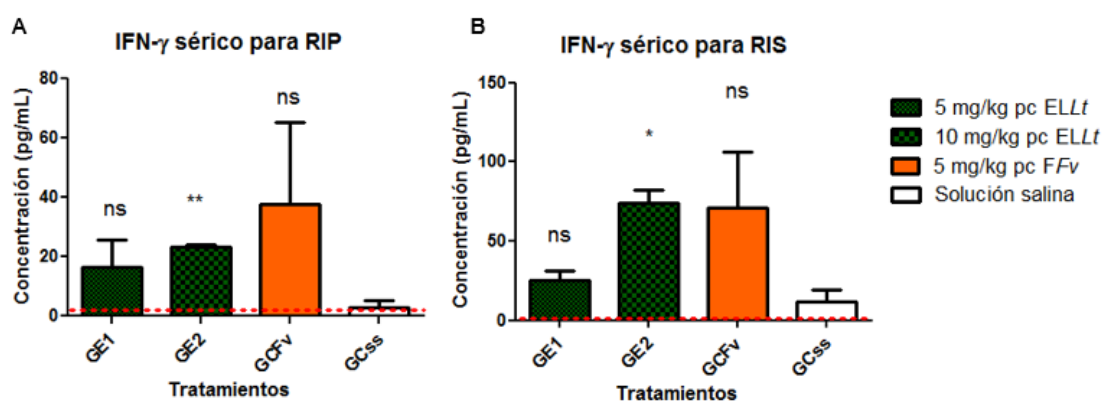
**Figura 23. Cuantificación de TNF- $\alpha$  en suero mediante ELISA.** A. Para RIP, se tiene que la concentración de TNF- $\alpha$  para los grupos tratados con extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata* es mayor que la del grupo control (GCss), pero la diferencia no es significativa. Sin embargo, la concentración sobrepasa ligeramente el límite de detección del kit (16 pg/mL). B. Para RIS, se observa el incremento en el grupo tratado con 10 mg/kg pc de extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, comparado con el control, sin embargo, este incremento no es significativo. ELLt: Extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, FFv: Fucoïdan de *Fucus vesiculosus*. GE1: 5 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, GE2: 10 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, GCFv: 5 mg/kg de fucoïdan de *Fucus vesiculosus*, GCss: control negativo. \*:  $p < 0.05$ .

**La producción de IFN- $\gamma$**  en el suero fue cuantificada mediante un ELISA de tipo sándwich a partir de una curva estándar elaborada con IFN- $\gamma$  liofilizado de ratón (Anexo 9B). Se observa en la Figura 25 la concentración de IFN- $\gamma$  presente en el suero de ratones inmunizados y tratados con fucoidan. Para RIP (A) se tiene que la concentración de IFN- $\gamma$  en los grupos tratados con extracto o con fucoidan es mayor a la del grupo control, sin embargo, en los grupos tratados con 5 mg/kg pc de extracto liofilizado rico en fucoidan esta diferencia no es significativa ( $p>0.05$ ), en cambio, en el grupo tratado con 10 mg/kg pc de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* la diferencia si es significativa ( $p<0.01$ ). Las diferencias entre cada grupo tratado no son significativas ( $p>0.05$ ).

Para RIS (B), se observa que la concentración de IFN- $\gamma$  en los grupos tratados con fucoidan es mayor a la del grupo control, pero se tiene que, en los grupos tratados con 5 mg/kg pc de extracto o de fucoidan, esta diferencia no es significativa ( $p>0.05$ ). Entre grupos, las diferencias no son significativas ( $p>0.05$ ).



**Figura 24. Evaluación de la producción de IFN- $\gamma$  en suero mediante ELISA.** En A y C se observan los pocillos a los que se han agregado el cromógeno TMB 1X, y en B y D se observan los pocillos luego de agregarse la solución STOP (ácido fosfórico 1M). GE1: 5 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GE2: 10 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, GCFv: 5 mg/kg de fucoidan de *Fucus vesiculosus*, GCss: control negativo.

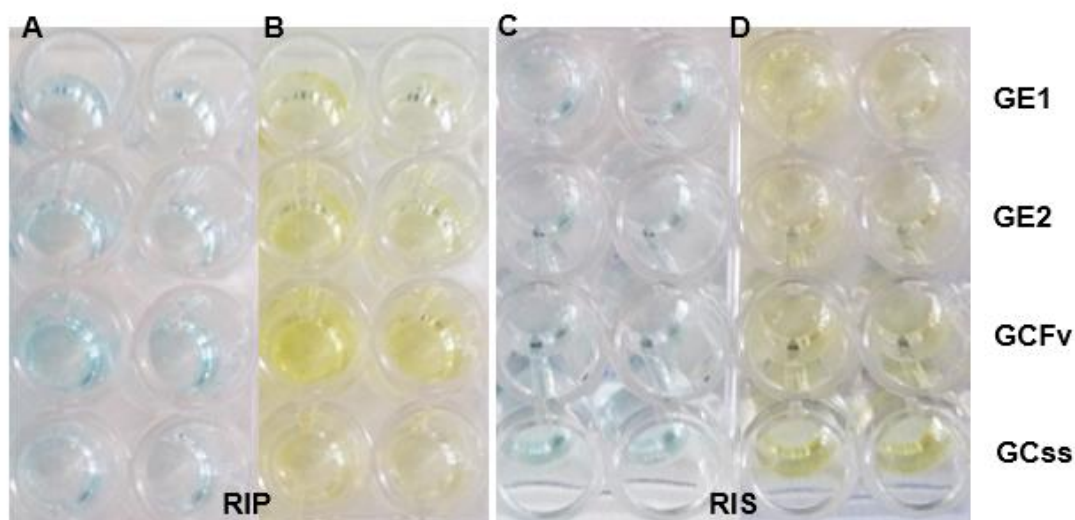


**Figura 25. Cuantificación de IFN-γ en suero mediante ELISA.** A. Para RIP, se tiene que hay incremento en la concentración de IFN-γ entre los grupos tratados con extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata* y el grupo control (GCss), en el caso del grupo tratado con 10 mg/kg pc de extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata* ese incremento es significativo. B. Para RIS, se observa el incremento en la concentración de IFN-γ entre los grupos tratados con fucoïdan de *Lessonia trabeculata* y el control. ELLt: Extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, FFv: Fucoïdan de *Fucus vesiculosus*. GE1: 5 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, GE2: 10 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, GCFv: 5 mg/kg de fucoïdan de *Fucus vesiculosus*, GCss: control negativo. \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ .

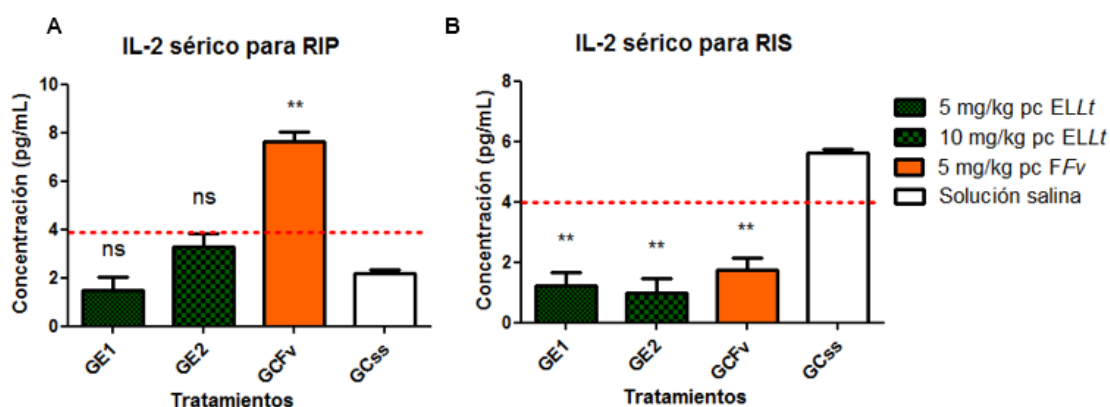
**La producción de IL-2** en suero fue medida mediante un ELISA tipo sándwich a partir de una curva estándar elaborada con IL-2 liofilizado de ratón (Anexo 9C). La concentración se observa en la Figura 27. Para RIP (A), se tiene que la concentración de IL-2 en el grupo tratado con fucoïdan de *Fucus vesiculosus* es mayor que la del grupo control ( $p < 0.01$ ), el grupo tratado con 10 mg/kg pc de extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata* tiene mayor concentración que el grupo control, y el grupo tratado con 5 mg/kg pc de extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata* presenta menor concentración que el grupo control, sin embargo estas diferencias no son significativas ( $p > 0.05$ ) y tampoco sobrepasan el límite de detección del kit (4 pg/mL). También se tiene que la diferencia entre los grupos tratados con 5 mg/kg pc de extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata* o fucoïdan de *Fucus vesiculosus*, es significativa ( $p > 0.001$ ).

Para RIS (B), se observa que cada grupo tratado presenta menor concentración de IL-2 comparado con el grupo control, además, la diferencia es significativa ( $p < 0.01$ ). Las diferencias entre los grupos tratados no son significativas ( $p > 0.05$ ).





**Figura 26. Evaluación de la producción de IL-2 en suero mediante ELISA.** En A y C se observan los pocillos a los que se han agregado el cromógeno TMB 1X, y en B y D se observan los pocillos luego de agregarse la solución STOP (ácido fosfórico 1M). GE1: 5 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, GE2: 10 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, GCFv: 5 mg/kg de fucoïdan de *Fucus vesiculosus*, GCss: control negativo.



**Figura 27. Cuantificación de IL-2 en suero mediante ELISA.** Se observa que los valores de la mayoría de los grupos de tratamiento presentan una concentración menor al  mite de detección del kit (4 pg/mL). A. Para RIP, se tiene que la concentración de IL-2 en los grupos tratados con extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata* es mayor a la del grupo control (GCss), sin embargo, esta diferencia no es significativa. B. Para RIS, la concentración de IL-2 disminuye significativamente en los grupos tratados con extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata* o fucoïdan de *Fucus vesiculosus*, con respecto al control. ELLt: Extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, FFv: Fucoïdan de *Fucus vesiculosus*. GE1: 5 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, GE2: 10 mg/kg de extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*, GCFv: 5 mg/kg de fucoïdan de *Fucus vesiculosus*, GCss: control negativo. \*\*:  $p < 0.01$ .

## VI. DISCUSIÓN

El alga *Lessonia trabeculata* proveniente de la bahía de San Nicolás, Nasca, Ica, posee, en su composición, carbohidratos como son los polisacáridos, compuestos fenólicos tales como polifenoles, taninos, cardenólidos y triterpenos, también flavonoides y elementos trazas como calcio, magnesio, hierro, zinc, manganeso, cobre y sodio (Apumayta, 2019). En las frondas es posible encontrar mayor cantidad de carbohidratos comparado al resto del alga (Chávez-Pérez *et al.*, 2017). Entonces, el extracto de *Lessonia trabeculata* no contiene únicamente fucoidan en su composición, sino otros componentes que pueden afectar el efecto inmunomodulador.

Algunos polifenoles obtenidos de plantas presentan efecto inmunomodulador comprobado, potenciando la acción de linfocitos T e inhibiendo la producción de citoquinas proinflamatorias (Ghiringhelli *et al.*, 2012). También se ha reportado que *Ecklonia cava* posee florotaninos que tienen potencial antiviral, antialérgico, antiproliferativo y antiinflamatorio (Wijesekara *et al.*, 2010). Otro componente en el alga es la fucoxantina, que le da al extracto un color pardo, y que tiene propiedades antitumorales y antiinflamatorias (Zorofchian *et al.*, 2014; Heo *et al.*, 2010). Sin embargo, no se ha reportado las propiedades de estos compuestos provenientes de *Lessonia trabeculata*, por lo que es posible que estén afectando el efecto inmunomodulador del fucoidan.

Al denominar un extracto como rico en su componente principal, se está determinando que tiene un porcentaje mayor al 80% del total del extracto (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2013), en el caso del extracto de *Lessonia trabeculata*, se señala que es un extracto rico en fucoidan debido a que tiene un porcentaje de fucoidan del 83.4% (Anexo 3).

Las técnicas de extracción del fucoidan influyen en la calidad del fucoidan obtenido, debido a que es importante mantener su integridad, además de que el fucoidan debe tener un alto porcentaje de fucosa, sulfatos, y baja cantidad de contaminantes como



proteínas y ácidos urónicos (Ale y Meyer, 2013). Qu *et al.*, (2014) determinaron que el porcentaje de azúcares del fucoïdan de *Lessonia trabeculata* es el más alto del estudio (66.38%) comparado con otras algas pardas (*Laminaria japonica*, *Lessonia nigrescens*, *Ascophyllum mackaii* y *Ecklonia máxima*), presenta un porcentaje de 16.39% de sulfatos, 1.18% de proteínas y 0.02% de ácidos urónicos, y tiene un peso molecular de 105 kDa. January *et al.* (2019) reporta altos porcentajes de fucosa y sulfatos en *Ecklonia maxima*, *Laminaria pallida* y *Splachnidium rugosum*, además de pesos moleculares mayores a 100 kDa

Apumayta (2019) caracterizó el fucoïdan proveniente de *Lessonia trabeculata* recolectada de la bahía de San Nicolás, en Nasca, encontrando 58.72% de azúcares, 9.48% de sulfatos, 0.024% de proteínas y 35.49% de ácidos urónicos, y posee un peso molecular de 9.921 kDa. La técnica de extracción del fucoïdan de *Lessonia trabeculata* para este trabajo probablemente no ha sido la más adecuada, ya que los reportes anteriores determinan pesos moleculares mucho mayores, y un menor contenido de contaminantes, por lo que no podría ser tomado como una referencia adecuada. En menor medida, estas diferencias son influenciadas por la zona de extracción, debido a las variantes geográficas, el macrobentos existente en esas zonas, la época del año en la que es recogida el alga y, probablemente, la actividad extractiva indiscriminada y los daños que pueda causar la presencia humana en la zona de extracción (Zavala *et al.*, 2015).

El efecto inmunomodulador del fucoïdan de diversas algas pardas ha sido analizado en múltiples estudios, mayormente *in vitro* y *ex vivo*, en los cuales se evalúan diversos parámetros, como la producción de óxido nítrico, inmunoglobulinas en suero, fagocitosis a nivel de macrófagos, apoptosis, niveles de expresión de diversas citoquinas de respuesta celular y humoral, además de la cantidad de las mismas en el sobrenadante de cultivo de células *ex vivo* o en suero de animales tratados.

El bazo es un órgano importante para el sistema inmune ya que en la pulpa blanca se encuentran los linfocitos que reaccionan ante los antígenos traídos por la sangre (Abbas *et al.*, 2015). Un análisis por citometría de flujo a bazos de ratones macho de la cepa BALB/c, de aproximadamente 13 semanas, determina que hay un porcentaje de 41% de linfocitos B, 39% de linfocitos T, 7.5% de monocitos y 0.3% de linfocitos NK, de un total aproximado de  $458.5 \times 10^6$  leucocitos por bazo (Taconic Biosciences, 2011). En este trabajo se emplearon esplenocitos de ratones inmunizados y tratados con fucoidan para evaluar la respuesta inmune celular.

Un punto a tener en cuenta es el antígeno que se ha estado usando para observar el efecto inmunomodulador del extracto liofilizado rico en fucoidan, que son los GRC. Estas células pasan por el bazo y son procesadas de forma dependiente de linfocitos T (Van den Eertwegh *et al.*, 1992). Stamm *et al.* (2013) encontraron que, al inocular GRC a ratones vía intravenosa, inducen a la proliferación de linfocitos T. Esto se debe a que la proteína reguladora de señal  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ), que se encuentra presente en macrófagos, no reconoce la proteína CD47 (presente en la membrana celular de células sanguíneas) de los GRC, además, los GRC activan las células dendríticas esplénicas que se unen a linfocitos T CD4 (Yi *et al.*, 2015). Entonces, al momento de inmunizar al ratón con GRC, se estaría induciendo al tipo de respuesta Th1, que podría ser estimulado por la presencia del extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*.

La producción de ERO en los esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados y tratados es baja y, en el caso de RIP, no hay diferencias significativas entre tratamientos (Figura 16). Las ERO son producidas en fagocitos, como macrófagos, y también se emplean líneas celulares como RAW 264.7, para evidenciar la producción de ERO. Choi *et al.* (2005) demostraron que los macrófagos estimulados con fucoidan de *Fucus vesiculosus* poseen mayor actividad fagocítica debido a la reducción del NBT, lo que haría suponer que existe gran producción de aniones superóxido. Colona-

Vallejos *et al.* (2015) demuestra que, al emplear el extracto de *Lessonia trabeculata* sobre células mononucleares de sangre periférica, que contienen monocitos, hay mayor reducción del NBT con respecto al control. Oroya (2019) también encuentra que la producción de ERO es incrementada, en macrófagos peritoneales, al tratar ratones con extracto de *Lessonia trabeculata*. Es probable que la baja producción de ERO en los esplenocitos se deba a que hay bajas cantidades de macrófagos.

La producción de NO en los esplenocitos de los ratones inmunizados y tratados es demasiado baja en todos los tratamientos (Figura 17). Las células productoras de NO son los fagocitos, como los macrófagos. En muchos estudios se emplea la línea celular de macrófagos RAW 264.7 para evaluar si el fucoidan purificado podría ocasionar incremento en la producción de NO: Choi *et al.* (2005) demostraron que el fucoidan de *Fucus vesiculosus* produce mayores niveles de nitrito que el grupo control, y este efecto es dosis dependiente, ya que aumenta el nivel de nitrito cuando aumenta la concentración de fucoidan. Lee *et al.* (2012) emplearon fracciones de fucoidan con distintas concentraciones de carbohidratos y sulfatos extraídos de *Ecklonia cava* a diferentes concentraciones y encontraron que la fracción de fucoidan con 57% de carbohidratos y 20% de sulfato produce mayor nivel de NO que las demás fracciones, sin embargo, la producción de NO disminuye en relación a la concentración de fucoidan empleada.

Un estudio de Jang *et al.* (2014), que emplea cultivo de esplenocitos para visualizar el efecto del fucoidan de *Undaria pinnatifida* en la producción de NO, demuestra que el fucoidan de alto peso molecular la estimula, comparado con el fucoidan de bajo peso molecular. Oroya (2019) también obtiene que los macrófagos peritoneales incrementan la producción de NO en la respuesta inmune primaria y secundaria de ratones tratados con extracto de *Lessonia trabeculata*.

Es muy importante tener en cuenta que la expresión de ARNm de cualquier citoquina no necesariamente está relacionada de manera directa al nivel de citoquina secretado,

debido a que puede haber variaciones al momento de traducir el ARNm, o al momento de regular la secreción de la citoquina producida (Van den Eertwegh *et al.*, 1992).

La expresión de ARNm y producción de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  se observan en las Figuras 18 y 23. Se tienen diferencias entre el nivel de expresión del ARNm y la cantidad de la proteína presente en el suero, por cada tratamiento. El nivel de ARNm en el GE2 (tratado con extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*) para RIP es mayor con respecto al control, sin embargo, la cantidad en suero del mismo grupo no supera el límite de detección del kit. En RIS, GE1 (tratado con extracto liofilizado rico en fucoïdan de *Lessonia trabeculata*) tuvo mayor expresión génica de TNF- $\alpha$ , aunque no se vio reflejado en la concentración en suero. La concentración de TNF- $\alpha$  en el suero fue elevada en GCFv (tratado con fucoïdan de *Fucus vesiculosus*), para ambos tipos de respuestas, lo cual no se ve reflejado en la expresión.

TNF- $\alpha$  es una de las citoquinas más analizadas al momento de determinar el efecto inmunomodulador de algún compuesto, ya que está involucrada en el desencadenamiento de la actividad inflamatoria. Khil'chenko *et al.* (2011), que trabajaron *in vitro* con fucoïdan de *Fucus evanescens*, demostraron que existe un efecto dosis dependiente en la producción de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante de células dendríticas y macrófagos derivados de médula ósea. Además, en neutrófilos humanos, también se observa mayor producción de estas citoquinas con el fucoïdan obtenido de *Macrocystis pyrifera* (Zhang *et al.*, 2015). En el caso del ARNm, se tiene que, empleando fucoïdan de *Ecklonia cava*, hay disminución de TNF- $\alpha$  de acuerdo a la dosis dada (Lee *et al.*, 2012).

TNF- $\alpha$  promueve la activación de macrófagos para la presentación antigénica, lo cual hace a esta citoquina importante para la generación de linfocitos efectores Th1. Jin *et al.* (2014) demostraron que el fucoïdan de *Fucus vesiculosus* induce a la maduración de células dendríticas en bazo, lo cual genera que exista incremento en la expresión

de TNF- $\alpha$  en esplenocitos y concentración de la citoquina en el suero. Por lo tanto, el extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* estaría induciendo la maduración de células dendríticas en el bazo, lo que explica el incremento de la expresión de TNF- $\alpha$  en ambos grupos. Inclusive, en RIP, la expresión de TNF- $\alpha$  es mayor en GE2 que en GCFv, lo cual indicaría que este incremento sería dosis dependiente.

En el trabajo de Jin *et al.* (2014) el suero y los esplenocitos fueron recolectados a las tres horas (para RIP) y a los tres días (para RIS) de la administración del fucoidan. El tiempo de la extracción del suero y de los esplenocitos es importante para la correcta cuantificación de TNF- $\alpha$ , ya que el pico de expresión y de citoquina secretada en el ratón se da a las pocas horas de la estimulación. En este trabajo, la extracción del suero y de los esplenocitos se dio a los 15 y 28 días del tratamiento con el extracto, por lo que la cantidad de TNF- $\alpha$  no era muy alta.

No todos los extractos de algas pardas tienen efecto estimulante sobre la expresión de TNF- $\alpha$ . Ahn *et al.* (2007) obtuvieron un extracto de *Ecklonia cava* que fue procesado con Kojizyme, un tipo de proteasa, que presentaba alto contenido en polifenoles, y este extracto disminuye la expresión de TNF- $\alpha$  en esplenocitos murinos. Esto podría deberse a un efecto antagónico entre los polifenoles y el fucoidan presentes en este extracto. Hay que considerar que el extracto de *Lessonia trabeculata* empleado en este trabajo posee polifenoles en cantidades bajas.

Para TNF- $\beta$  se observa el nivel de expresión de ARNm en los esplenocitos de los ratones inmunizados y tratados (Figura 19). Para RIP hay disminución dosis dependiente del nivel de expresión, y en RIS hay incremento dosis dependiente del nivel de expresión.

El rol de TNF- $\beta$ , también conocida como linfotoxina, no ha sido muy estudiado en inmunomodulación. Es una citoquina expresada en linfocitos T CD4+, T citotóxicos,

NK, B y macrófagos, y está involucrada en la respuesta ante infecciones por *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium*, *Plasmodium* y *Leishmania* (Calmon-Hamaty *et al.*, 2011). Sin embargo, los mecanismos de acción de esta citoquina aún no han sido dilucidados.

Un estudio de Hsu *et al.* (1997) evaluó el efecto inmunomodulador de una proteína del hongo *Volvariella volvacea*, encontrando que hay niveles altos de expresión de TNF- $\beta$  comparado con el control. Leiro *et al.* (2006) encontraron que la línea celular RAW264.7 expuesta a un polisacárido ácido obtenido de *Ulva rigida* no expresa TNF- $\beta$ . Hirose *et al.* (1990) emplearon un polisacárido unido a proteína de un hongo sobre células mononucleares de sangre periférica, encontrando que la expresión de TNF- $\beta$  no es inducida por la presencia de este polisacárido. Hay relación entre la naturaleza del inmunomodulador y la expresión de TNF- $\beta$ , debido a que las proteínas promueven a la expresión de TNF- $\beta$ , además de TNF- $\alpha$ , sin embargo los polisacáridos solo promueven a la expresión de TNF- $\alpha$ , lo cual es observado en RIP.

La expresión de ARNm y producción de IFN- $\gamma$  se observa en las Figuras 20 y 25. No se ve expresión de ARNm, pero si hay presencia de la citoquina en el suero para GE1 y GE2, y, en el caso de RIS, la que presenta mayor cantidad en suero es GE2. En el caso de RIP, se tiene que el fucoidan de *Fucus vesiculosus* presenta mayor cantidad de IFN- $\gamma$ .

IFN- $\gamma$  es una citoquina expresada para la activación de macrófagos y es importante para la respuesta inmune adaptativa. En trabajos con esplenocitos, se observa el aumento de esta citoquina (Jin *et al.*, 2014, utilizando fucoidan de *Fucus vesiculosus*; Jang *et al.*, 2014, usando fucoidan de *Undaria pinnatifida*; Zhang *et al.*, 2015, empleando fucoidan de *Macrocystis pyrifera*), lo cual indica que el fucoidan estaría fomentando a la diferenciación de linfocitos T a linfocitos efectores Th1. Esta diferenciación se estaría dando a los 3 días de inocular ip el fucoidan, ya que se

encuentra ARNm de IFN- $\gamma$  en mayor proporción que el control, y aproximadamente 10000 pg/mL de IFN- $\gamma$  en el suero.

Hay que tener en cuenta el tiempo en el cual se realizó la extracción del suero y de los esplenocitos para cuantificar IFN- $\gamma$ . Es posible que el ratón ya estuviera en las etapas finales de la respuesta inmune, en donde las células en exceso entran en un proceso apoptótico para mantener la homeostasis en el organismo.

Se tiene la expresión de ARNm y producción de IL-2 en las Figuras 21 y 27. Para RIP no hay expresión de ARNm, y en RIS hay mayor expresión GE2 con respecto al control. Sin embargo, a nivel de suero, en RIP, la cantidad de IL-2 apenas supera el límite de detección del kit, y en RIS es menor a la cantidad en el grupo control.

La IL-2 no es muy empleada para observar el efecto inmunomodulador, a pesar de ser una de las citoquinas más importantes para la respuesta inmune adaptativa. Posee funciones que son contradictorias, ya que por un lado fomenta la diferenciación de linfocitos T y también regula de forma negativa la expansión clonal de linfocitos, al momento de terminar la respuesta inmune, a fin de mantener la homeostasis (Bachmann y Oxenius, 2007). Elugo (2019) no encuentra expresión génica de IL-2 en células mononucleares de sangre periférica tratadas con extracto de *Lessonia trabeculata*. Halling *et al.* (2015) demostraron que, en ratones tratados con fucoidan de *Laminaria hyperborea*, hay incremento en la expresión de IL-2 de forma dosis dependiente. Además, encuentran que existe incremento de la actividad fagocítica de esplenocitos aislados, por lo que mencionan que el incremento de la expresión génica de IL-2 está relacionado directamente con la actividad fagocítica. Oroya (2019) determinó que existe incremento de la actividad fagocítica en RIS, lo cual concuerda con los resultados obtenidos para RIS sobre el incremento en la expresión de IL-2. Debido a esto, es posible determinar que la presencia de IL-2 estimula la fagocitosis mediada por macrófagos, el cual es un mecanismo de la respuesta celular innata.

## VII. CONCLUSIONES

1. En los esplenocitos de ratones inmunizados y tratados con extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, tanto en respuesta primaria como secundaria no se observó producción significativa de NO y ERO.
2. En respuesta inmune primaria, el extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata*, promueve la expresión génica de TNF- $\alpha$  en esplenocitos de ratones inmunizados, mientras que para respuesta inmune secundaria se inhibe la expresión génica de esta citoquina de forma dosis dependiente y presenta alta concentración en suero, lo que indica que se está estimulando la respuesta inmune celular innata.
3. En la respuesta inmune primaria, el extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* inhibe la expresión génica de TNF- $\beta$  (linfotoxina) en esplenocitos de ratones inmunizados, mientras que, para respuesta inmune secundaria, la expresión génica es promovida de forma dosis dependiente, lo que indica que se está estimulando la respuesta inmune celular.
4. Tanto en respuesta inmune primara como en secundaria, el extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* incrementa la concentración sérica de IFN- $\gamma$  de forma dosis dependiente, lo que significa que está estimulando la respuesta inmune celular adaptativa.
5. En respuesta inmune secundaria, el extracto liofilizado rico en fucoidan de *Lessonia trabeculata* promueve la expresión génica de IL-2 en esplenocitos de ratones inmunizados, mientras que no se detectó IL-2 sérica en el tiempo que duró el ensayo.



## VIII. RECOMENDACIONES

1. Repetir el procedimiento empleando rangos más cortos de tiempo para considerar y estudiar la respuesta inmune innata y adaptativa de forma diferenciada.
2. Analizar la concentración sérica de TNF- $\beta$  para corroborar la información obtenida en expresión génica.
3. Realizar el aislamiento del fucoideano a partir del extracto rico en fucoideano de *Lessonia trabeculata*, además del aislamiento y caracterización de los otros componentes bioactivos del extracto, para repetir el procedimiento detallado en esta tesis, a fin de poder identificar el efecto inmunomodulador de cada compuesto por separado.
4. Analizar otras citoquinas de respuesta celular, como IL-12, TGF- $\beta$ , algunos factores de transcripción, como T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t, y genes para proteínas involucradas en la producción de ROS y NO, como iNOS, a fin de dilucidar la vía completa de acción del fucoideano de *Lessonia trabeculata*.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). Inmunología celular y molecular. Octava edición. *Editorial Elsevier Health Sciences Spain*.
- Ahn, G., Hwang, I., Park, E., Kim, J., Jeon, YJ., Lee, J., Park, JW., Jee, Y. (2007) Immunomodulatory effects of an enzymatic extract from *Ecklonia cava* on murine splenocytes. *Marine Biotechnology*, 10: 278-289.
- Ale, M. T., & Meyer, A. S. (2013). Fucoidans from brown seaweeds: an update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation. *RSC Advances*, 3(22), 8131-8141.
- Apumayta, E. (2019). Actividad antioxidante y determinación del contenido de fucoidano, compuestos fenólicos y flavonoides en extractos de macroalga parda *Lessonia trabeculata*. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Bachmann, M. F., & Oxenius, A. (2007). Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO reports*, 8(12), 1142-1148.
- Baehner, R., Boxer, L., & Davis, J. (1976). The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. *Blood*, 48(2), 309-313.
- Basel Declaration (2010). Basel Declaration. *Recuperado de <https://www.basel-declaration.org/>*
- Bazzoni, F., & Beutler, B. (1996). The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *New England Journal of Medicine*, 334(26), 1717-1725.
- Bilan, M. I., Grachev, A. A., Shashkov, A. S., Nifantiev, N. E., & Usov, A. I. (2006). Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L. *Carbohydrate research*, 341(2), 238-245.

- Caja, V., Salas, N., Becerra, E., Bazán, D., Reyna, L., Cornejo, O., Lellish, M. (2004). Obtención de ácido algínico a partir del alga *Lessonia trabeculata*. *Rev. Per. Quim. Ing. Quim.* 7 (2): 9-13.
- Calmon-Hamaty, F., Combe, B., Hahne, M., & Morel, J. (2011). Lymphotoxin  $\alpha$  revisited: general features and implications in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, 13(4), 232.
- Chabalgoity, J., Pereira, M., & Rial, A. (2006). Inmunidad contra los agentes infecciosos. *Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2a ed. Uruguay: FEFMUR*, 99-114.
- Chandía, N. P., & Matsuhira, B. (2008). Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(3), 235-240.
- Chávez-Pérez, J., Apumayta-Suárez, E., Loayza-Gutiérrez, L., Casimiro-González, S., Rabanal-Atalaya, M. (2017) Screening fitoquímico y contenido de elementos traza del alga parda *Lessonia trabeculata* procedente de la bahía de San Nicolas de Marcona, Ica – Perú. *En Libro de Resúmenes del VI Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal – Lima, Perú.*
- Chevolot, L., Foucault, A., Chaubet, F., Kervarec, N., Siquin, C., Fisher, A. M., & Boisson-Vidal, C. (1999). Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. *Carbohydrate Research*, 319(1-4), 154-165.
- Chizhov, A. O., Dell, A., Morris, H. R., Haslam, S. M., McDowell, R. A., Shashkov, A. S., ... & Usov, A. I. (1999). A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydrate Research*, 320(1-2), 108-119.
- Choi, E. M., Kim, A. J., Kim, Y. O., & Hwang, J. K. (2005). Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan in vitro. *Journal of medicinal food*, 8(4), 446-453.

Colona-Vallejos, E. H., Alzamora-Gonzales, L., Chauca-Torres, N. E., & Villena-Sarmiento, G. (2015). Immunomodulatory activity of an extract from *Lessonia trabeculata* on human peripheral blood mononuclear cells. In *Front. Immunol. Conference Abstract: IMMUNOCOLOMBIA2015–11th Congress of the Latin American Association of Immunology–10o. Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología (Vol. 12)*.

Cumashi, A., Ushakova, N. A., Preobrazhenskaya, M. E., D'incecco, A., Piccoli, A., Totani, L., ... & Usov, A. I. (2007). A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*, 17(5), 541-552.

Elugo, C. (2019). Modulación de la expresión transcripcional de citoquinas de respuesta inmune innata y adaptativa en células mononucleares de sangre periférica humana tratadas con fucoidan de *Lessonia trabeculata* Villouta & Santelices 1986. Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Fang, F. C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology*, 2(10), 820.

Fernandez, R. R. (2017). Extracción de compuestos fenólicos de la macroalga marina (*Lessonia trabeculata*), determinación de su Actividad Antioxidante y Evaluación Citotóxica. Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Química. Facultad de Ciencias Naturales y Formales, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

Gea-Banacloche, JC. Immunomodulation. Incluido en Runge, MS., Patterson, C. *Principles of Molecular Medicine, second edition, Humana Press, 2006, páginas 893-904*.

Ghiringhelli, F., Rebe, C., Hichami, A., & Delmas, D. (2012). Immunomodulation and anti-inflammatory roles of polyphenols as anticancer agents. *Anti-Cancer Agents in*

*Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 12(8), 852-873.

Gregersen, P. K., & Behrens, T. W. (2006). Genetics of autoimmune diseases—disorders of immune homeostasis. *Nature Reviews Genetics*, 7(12), 917.

Guiry, W. and Guiry, G.M. (2019) *Lessonia trabeculata* Villouta and Santelices. Algaebase.org [online]. 2019. [Accessed 18 July 2019]. Available from: [http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=12164](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=12164)

Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 315-326.

Halling, B. P., Vetvicka, V., & Blakemore, W. R. (2015). Evaluation of The Immunomodulatory In vivo Activity of *Laminaria hyperborea* Fucoidan Relative to Commercial (1, 3/1, 6)-B-D-Glucans from Yeast and Mushrooms. *Journal of Nutrition and Health Sciences*, 2(2), 1.

Han, Y. S., Lee, J. H., & Lee, S. H. (2015). Antitumor effects of fucoidan on human colon cancer cells via activation of Akt signaling. *Biomolecules & therapeutics*, 23(3), 225.

Heo, S. J., Yoon, W. J., Kim, K. N., Ahn, G. N., Kang, S. M., Kang, D. H., ... & Jeon, Y. J. (2010). Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2045-2051.

Hirose, K., Zachariae, C. O., Oppenheim, J. J., & Matsushima, K. (1990). Induction of gene expression and production of immunomodulating cytokines by PSK in human peripheral blood mononuclear cells. *Lymphokine research*, 9(4), 475-483.

Horna, M. (2018). Citotoxicidad de un extracto con fucoidanos obtenidos de algas pardas sobre la línea celular HEP-2 (Human Epidermoid Carcinoma strain 2). Tesis

para optar el Título Profesional de Biólogo con Mención en Zoología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Hsu, H. C., Hsu, C. I., Lin, R. H., Kao, C. L., & Lin, J. Y. (1997). Fip-vvo, a new fungal immunomodulatory protein isolated from *Volvariella volvacea*. *Biochemical Journal*, 323(2), 557-565.

Jang, J. Y., Moon, S. Y., & Joo, H. G. (2014). Differential effects of fucoidans with low and high molecular weight on the viability and function of spleen cells. *Food and chemical toxicology*, 68, 234-238.

January, G. G., Naidoo, R. K., Kirby-McCullough, B., & Bauer, R. (2019). Assessing methodologies for fucoidan extraction from South African brown algae. *Algal Research*, 40, 101517.

Jin, J. O., Zhang, W., Du, J. Y., Wong, K. W., Oda, T., & Yu, Q. (2014). Fucoidan can function as an adjuvant in vivo to enhance dendritic cell maturation and function and promote antigen-specific T cell immune responses. *PloS one*, 9(6), e99396.

Jung, W. K., Athukorala, Y., Lee, Y. J., Cha, S. H., Lee, C. H., Vasanthan, T., ... & Jeon, Y. J. (2007). Sulfated polysaccharide purified from *Ecklonia cava* accelerates antithrombin III-mediated plasma proteinase inhibition. *Journal of applied phycology*, 19(5), 425-430.

Khil'chenko, S. R., Zaporozhets, T. S., Shevchenko, N. M., Zvyagintseva, T. N., Vogel, U., Seeberger, P., & Lepenies, B. (2011). Immunostimulatory activity of fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens*: Role of sulfates and acetates. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 30(4-6), 291-305.

Lee, S. H., Ko, C. I., Ahn, G., You, S., Kim, J. S., Heu, M. S., Kim, J., Jee, Y. H. & Jeon, Y. J. (2012). Molecular characteristics and anti-inflammatory activity of the fucoidan extracted from *Ecklonia cava*. *Carbohydrate polymers*, 89(2), 599-606.

- Leiro, J. M., Castro, R., Arranz, J. A., & Lamas, J. (2007). Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International Immunopharmacology*, 7(7), 879-888.
- Li, B., Lu, F., Wei, X., Zhao, R. (2008). Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules* 13, 1671-1695.
- Llauradó Maury, G., Morris Quevedo, H. J., Albear, J. M., Castán Chibás, L., & Bermúdez Savón, R. C. (2011). Plantas y hongos comestibles en la modulación del sistema inmune. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 30(4), 511-527.
- Martínez-Manrique, C. E. (2005). Modulación de la respuesta Inmune. Tendencias vigentes. *Medisan*, 9(3).
- Martínez-Rodríguez, R., Navarro-Alarcón, M., Rodríguez-Martínez, C., & Fonollá-Joya, J. (2013). Efectos sobre el perfil lipídico en humanos de un extracto de algarroba (*Ceratonia siliqua* L.) rico en polifenoles, incluido en un lácteo como alimento funcional: estudio piloto. *Nutrición Hospitalaria*, 28(6), 2107-2114.
- Matsuhiro, B., & Zambrano, D. M. (1990). Carbohydrate constituents of *Lessonia trabeculata*. *Journal of Applied Phycology*, 2(2), 183-185.
- Medzhitov, R., & Janeway Jr, C. A. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current opinion in immunology*, 9(1), 4-9.
- Moslen, M. T. (1994). Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. In *Free Radicals in Diagnostic Medicine* (pp. 17-27). Springer, Boston, MA.
- Nagaoka, M., Shibata, H., Kimura-Takagi, I., Hashimoto, S., Kimura, K., Makino, T., ... & Yokokura, T. (1999). Structural study of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* Tokida. *Glycoconjugate journal*, 16(1), 19-26.

- Oroya, C. (2019). Estudio in vivo de la actividad moduladora del fucoidan de *Lessonia trabeculata* Villouta & Santelices (1986) sobre parámetros de la inmunidad innata y humoral. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Mayor de San Marcos.
- Ortuño-Sahagún, D., Zänker, K., Rawat, A., Kaveri, S. V., & Hegde, P. (2017). Natural Immunomodulators. *Journal of immunology research*, 2017, 7529408.
- O'Sullivan, S. T., Lederer, J. A., Horgan, A. F., Chin, D. H., Mannick, J. A., & Rodrick, M. L. (1995). Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Annals of surgery*, 222(4), 482.
- Overbergh, L., Valckx, D., Waer, M., & Mathieu, C. (1999). Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine*, 11(4), 305-312.
- Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A. & Jones, P. P. (2014). Kuby Inmunología. Séptima edición. *McGraw-Hill Interamericana Editores*.
- Pal, A., Kamthania, M. C., & Kumar, A. (2014). Bioactive compounds and properties of seaweeds—A review. *Open Access Library Journal*, 1(4), 1-17.
- Patankar, M. S., Oehninger, S., Barnett, T., Williams, R. L., & Clark, G. F. (1993). A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *Journal of Biological Chemistry*, 268(29), 21770-21776.
- Qu, G., Liu, X., Wang, D., Yuan, Y., & Han, L. (2014). Isolation and characterization of fucoidans from five brown algae and evaluation of their antioxidant activity. *Journal of Ocean University of China*, 13(5), 851-856.
- Reddy, J., Chastagner, P., Fiette, L., Liu, X., & Thèze, J. (2001). IL-2-induced tumor necrosis factor (TNF)- $\beta$  expression: further analysis in the IL-2 knockout model, and



comparison with TNF- $\alpha$ , lymphotoxin- $\beta$ , TNFR1 and TNFR2 modulation. *International immunology*, 13(2), 135-147.

Ruiz, G. A. (2018). Efecto anticoagulante por inhibición de la generación de trombina de fucoïdanos de bajo peso molecular de *Lessonia trabeculata* obtenidos por irradiación gamma. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*, 75(2), 163-189.

Shen, P., Yin, Z., Qu, G., & Wang, C. (2018). Fucoïdan and Its Health Benefits. In *Bioactive Seaweeds for Food Applications* (pp. 223-238). Academic Press.

Stamm, C., Barthelmann, J., Kunz, N., Toellner, K. M., Westermann, J., & Kalies, K. (2013). Dose-dependent induction of murine Th1/Th2 responses to sheep red blood cells occurs in two steps: antigen presentation during second encounter is decisive. *PloS one*, 8(6), e67746.

Sun, J., Zhang, X., Broderick, M., & Fein, H. (2003). Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors*, 3(8), 276-284.

Taconic Biosciences (2011). FACS Analysis of Splenocytes. Taconic Models for Life, Taconic Biosciences. *Recuperado de* <https://www.taconic.com/phenotypic-data/facs-analysis-of-splenocytes/>

Van den Eertwegh A.J., Boersma W.J., Claassen E. (1992). Immunological functions and in vivo cell-cell interactions of T cells in the spleen. *Crit Rev Immunol* 11: 337–380.

Vera, D. (2014). Efecto de la extracción del alga *Lessonia trabeculata*, Villouta & Santelices, sobre el macrobentos en Marcona, Perú. Tesis para optar el Grado de

Magíster Scientiae en Ecología Aplicada. Escuela de Postgrado, Universidad Nacional Agraria La Molina.

Vernon, P. J., & Tang, D. (2013). Eat-me: autophagy, phagocytosis, and reactive oxygen species signaling. *Antioxidants & redox signaling*, 18(6), 677-691.

Villouta, E. & Santelices, B. (1986). *Lessonia trabeculata* sp. nov. (Laminariales, Phaeophyta), a new kelp from Chile. *Phycologia* 25: 81-86.

Vishchuk, O. S., Ermakova, S. P., & Zvyagintseva, T. N. (2011). Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity. *Carbohydrate research*, 346(17), 2769-2776.

Wijesekara, I., Pangestuti, R., & Kim, S. K. (2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate polymers*, 84(1), 14-21.

Wijesekara, I., Yoon, N. Y., & Kim, S. K. (2010). Phlorotannins from *Ecklonia cava* (Phaeophyceae): Biological activities and potential health benefits. *Biofactors*, 36(6), 408-414.

Wijesinghe, W. A. J. P., & Jeon, Y. J. (2012). Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 13-20.

Yi, T., Li, J., Chen, H., Wu, J., An, J., Xu, Y., ... & Cyster, J. G. (2015). Splenic dendritic cells survey red blood cells for missing self-CD47 to trigger adaptive immune responses. *Immunity*, 43(4), 764-775.

Yu, A. C. H., & Lau, L. T. (2000). Expression of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 genes in astrocytes under ischemic injury. *Neurochemistry international*, 36(4-5), 369-377.

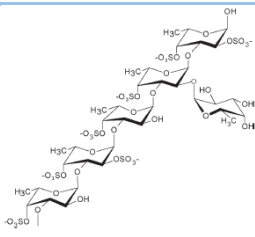
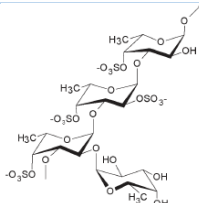
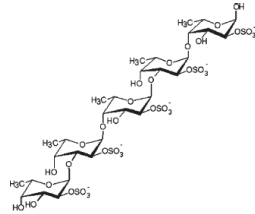
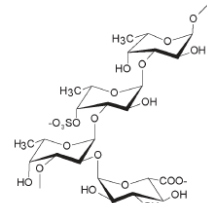
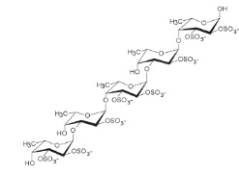
Zavala, J., Flores, D., Donayre, S., Zeballos, J., & Huamaní, S. (2015). Evaluación poblacional de *Lessonia trabeculata* Villouta y Santelices, 1986 en San Juan de Marcona, Marzo 2010. *Inf Inst Mar Perú*, 42 (4), 510-515.

Zhang, W., Oda, T., Yu, Q., & Jin, J. O. (2015). Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* has powerful immune-modulatory effects compared to three other fucoidans. *Marine drugs*, 13(3), 1084-1104.

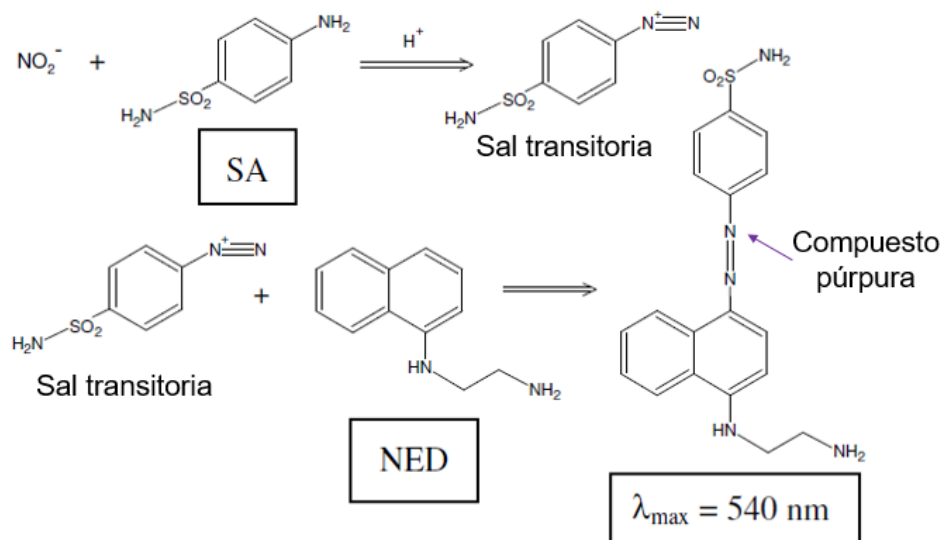
Zorofchian Moghadamtousi, S., Karimian, H., Khanabdali, R., Razavi, M., Firoozinia, M., Zandi, K., & Abdul Kadir, H. (2014). Anticancer and antitumor potential of fucoidan and fucoxanthin, two main metabolites isolated from brown algae. *The Scientific World Journal*, 2014.

## X. ANEXOS

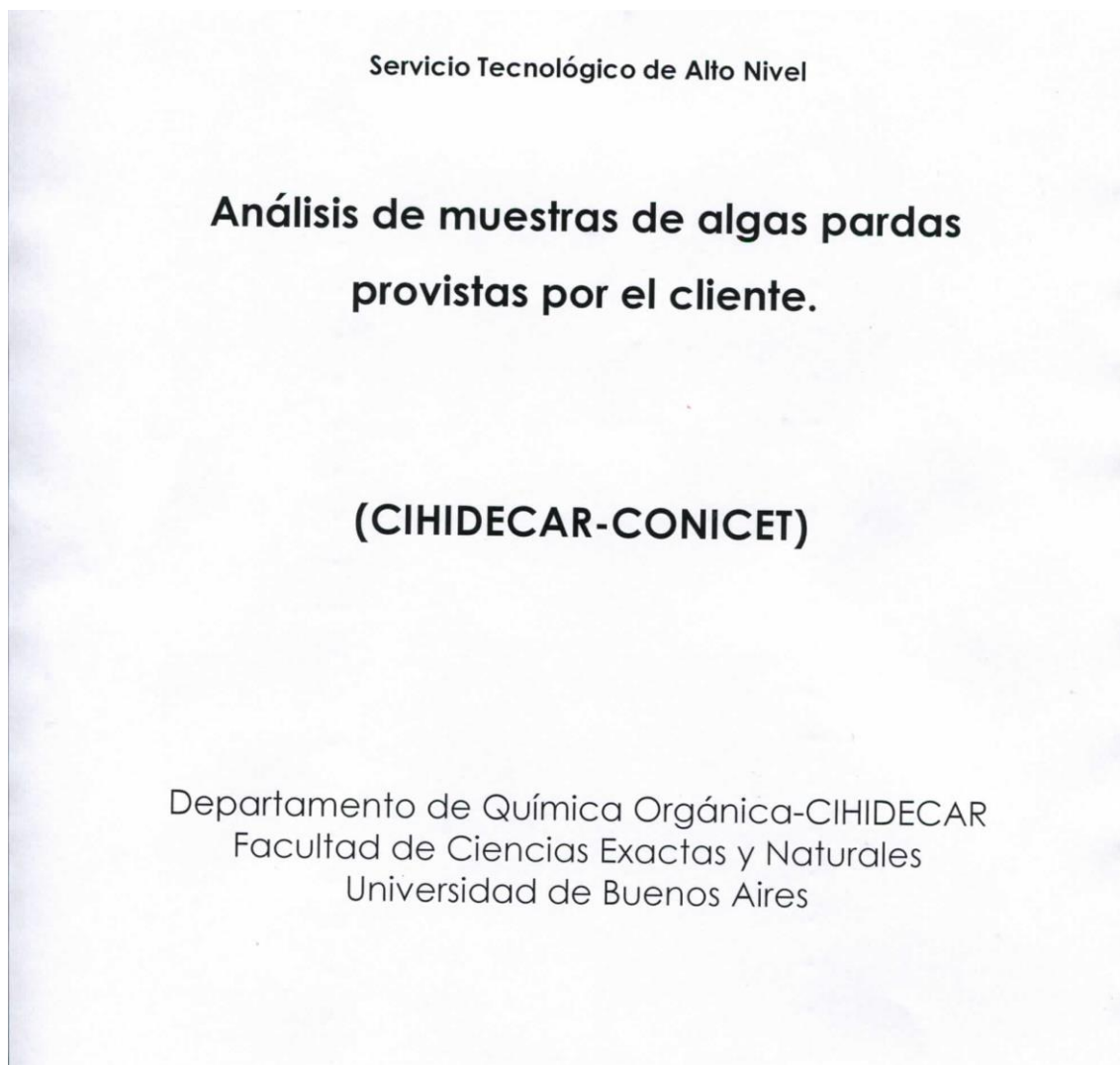
**ANEXO 1.** Estructuras reportadas del fucoidan de distintas especies de algas pardas de los órdenes Fucales, Ectocarpales y Laminariales. (Ale y Meyer, 2013).

Especie de alga	Orden	Elemento estructural del fucoidan	Notas
<b><i>Chorda filum</i></b>	Laminariales		Contiene una cadena principal de poli- $\alpha(1\rightarrow3)$ -fucopiranososa con un alto grado de ramificaciones, mayormente de $\alpha(1\rightarrow2)$ unidades ligadas. Sulfatada en las posiciones O-4 (mayormente) y O-2. Algunos residuos de $\alpha(1\rightarrow3)$ -fucosa ligada están 2-O-acetilados (Chizhov <i>et al.</i> , 1999).
<b><i>Laminaria saccharina</i></b>	Laminariales		Mayormente presenta residuos de $\alpha(1\rightarrow3)$ -a-L-fucopiranososa ligada y 4-sulfatada, y algunos de ellos presentan adicionalmente un sustituyente de 2-O- $\alpha$ -L-fucopiranosil o está 2-sulfatada (Cumashi <i>et al.</i> , 2007).
<b><i>Fucus serratus L.</i></b>	Fucales		Presenta una cadena principal constituida de residuos alternados de a-L-fucopiranososa ligadas en la posición 3 y 4, con aproximadamente la mitad de los residuos 3-ligados sustituidos en el C-4 por unidades de trifucósidos. Se demostró que los grupos sulfato fueron sustituidas mayormente en C-2, aunque algunos residuos terminales de fucosa no están sulfatados (Bilan <i>et al.</i> , 2006).
<b><i>Cladosiphon okamuranus</i></b>	Ectocarpales		La estructura principal es una cadena lineal de $\alpha(1\rightarrow3)$ -fucopiranososa con la mitad de las sustituciones de sulfato en C-4, y una porción de los residuos de fucosa están O-acetilados. Los residuos de ácido $\alpha$ -glucurónico están ligados en las posiciones C-2 de los residuos de fucosa que no han sido sustituidos por un grupo sulfato (Nagaoka <i>et al.</i> , 1999).
<b><i>Ascophyllum nodosum</i></b>	Fucales		Presenta una cadena principal de $\alpha(1\rightarrow3)$ -fucosa y una alta proporción de uniones $\alpha(1\rightarrow4)$ mayormente sulfatadas en O-2, y residuos de fucosa 2,3-O-disulfato fueron observados (Chevolot <i>et al.</i> , 1999)

**ANEXO 2.** Reacción de Griess. El nitrito es mezclado con sulfanilamida, lo que produce una sal de diazonio transitoria, luego, se le añade N-naftil-etilendiamina para producir un compuesto azo de coloración púrpura, que puede ser medido a una longitud de onda de 540 nm. (Sun *et al.*, 2003).



**ANEXO 3:** Certificado de porcentaje de fucoidan encontrado en el extracto liofilizado del alga *Lessonia trabeculata*, realizado por el Departamento de Química Orgánica-CIHIDECAR, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.



## RESULTADOS

La Tabla 1 presenta los resultados obtenidos en los análisis solicitados por la Empresa. Además se realizó la cuantificación de azúcares totales frente a un patrón de galactosa obteniéndose un 41,5 % anh. ( $\pm 2,7$ ).

**TABLA 1. Análisis de azúcares totales, ésteres sulfato, humedad y cationes, para la muestra suministrada por la Empresa.**

	Azúcares totales (% anh.)	Sulfatos (% SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	Humedad (%)	Cationes (g % g)			
				Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
PSW S.A. Muestra Fucoidano 1 Dializ.	59,0 $\pm$ 6,0	5,7 $\pm$ 0,3	12,3 %	0,71	0,65	7,1	0,33

## ANALISIS DE LOS RESULTADOS


La aplicación de la fórmula

$$\% \text{ Fuc} = \frac{59,0 + 5,7 + 0,71 + 0,65 + 7,1 + 0,33}{(100-12,3)} \times 100 = 83,4 \%$$

## BIBLIOGRAFIA

- 1- A.E.R, AHMED Y J.M. LABAVITCH. "A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content". *J. Food Biochem.*, **1**: 361-365, 1977.
- 2- M. DUBOIS, K.A. GILLÉS, J.K. HAMILTON, P.A. REBERS y F. SMITH. "Colorimetric method of determination of sugars and related substances". *Anal. Chem.*, **28**: 350-356, 1956.
- 3- K.S. DODGSON. "Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters". *Biochem. J.*, **78**: 312-319, 1961.
- 4- K.S. DODGSON y R.G. PRICE. "A note on the determination of ester sulphate content of sulphated polysaccharides". *Biochem. J.*, **84**: 106-110, 1962.

  
D. CARLOS A. STORTZ  
Investigador Principal  
CONICET

  
Dra. Nora M. Andrea Ponce  
Invest. Adjunta CONICET



#### ANEXO 4. Preparación de medio de cultivo RPMI-1640 para esplenocitos

Por 100 mL de medio RPMI-1640 (Merck), se añade, en completa esterilidad:

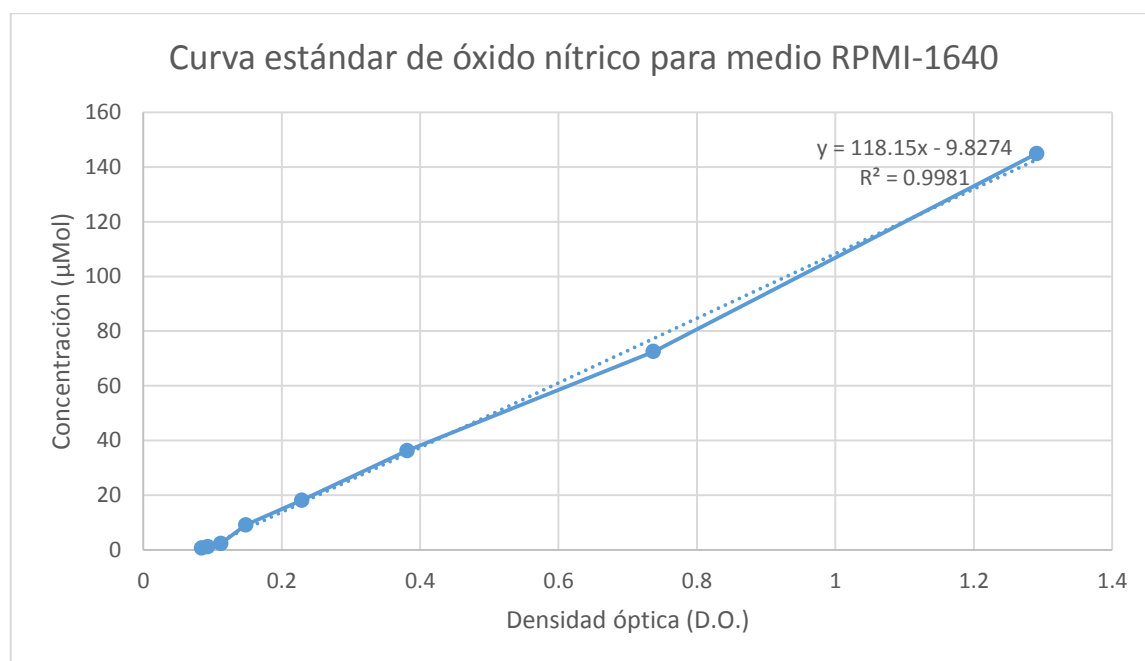
Bicarbonato de sodio.....2.6 mL

Aminoácidos no esenciales.....1 mL

Antibiótico.....1 mL

Para suplementar el medio, se coloca 10 mL de suero bovino fetal (SBF) por cada 100 mL de medio RPMI-1640.

#### ANEXO 5. Curva estándar para óxido nítrico (Kit Griess Reagent System, Promega)



**ANEXO 6.** Preparación de reactivos para el ensayo de nitroazul de tetrazolio

Nitroazul de tetrazolio (NBT) al 5%:

Solución salina balanceada de Hanks.....10 mL

Nitroazul de tetrazolio.....50 mg

Se diluye completamente y se filtra con un filtro de 0.2 µm de poro. Se conserva a -20°C protegido de la luz.

**ANEXO 7.** *Primers* empleados para la amplificación de las citoquinas TNF-α, TNF-β, IFN-γ e IL-2. Los *primers* fueron identificados mediante búsqueda bibliográfica, y se comprobó su ARNm diana empleando la herramienta Primer-BLAST ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)).

Citoquinas	Tamaño del amplicón (pb)	Secuencia	Número de accesoión (GenBank)	Referencia bibliográfica
TNF-α	396	F: 5'-GCGACGTGGAAGTGGCAGAAG-3'	NM_013693	Yu & Lau (2000)
		R: 5'-GGTACAACCCATCGGCTGGCA-3'		
TNF-β	486	F: 5'-CCCATGGCATCCTGAAAC-3'	NM_010735.2	Reddy <i>et al.</i> (2001)
		R: 5'-GGAGGCCTGGAATCCAAT-3'		
IL-2	168	F: 5'-TGATGGACCTACAGGAGCTCCTGAG-3'	NM_008366.3	O'Sullivan <i>et al.</i> (1995)
		R: 5'-GAGTCAAATCCAGAACATGCCGCAG-3'		
IFN-γ	92	F: 5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3'	NM_008337.4	Overbergh <i>et al.</i> (1999)
		R: 5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3'		
GAPDH	236	F: 5'-CTACTGGTGTCTTCACCACC-3'	NM_008084.3	Overbergh <i>et al.</i> (1999)
		R: 5'-GTGGCAGTGATGGCATGGAC-3'		

## ANEXO 8. Preparación de reactivos para electroforesis en gel de agarosa

- Buffer Tris base – Ácido bórico – EDTA 1X (1X-TBE)

Para preparar 1 litro de TBE 10X disuelva en 600 mL de agua desionizada:

Tris Base (FW = 121).....108 g

Ácido bórico (FW = 61.8).....55 g

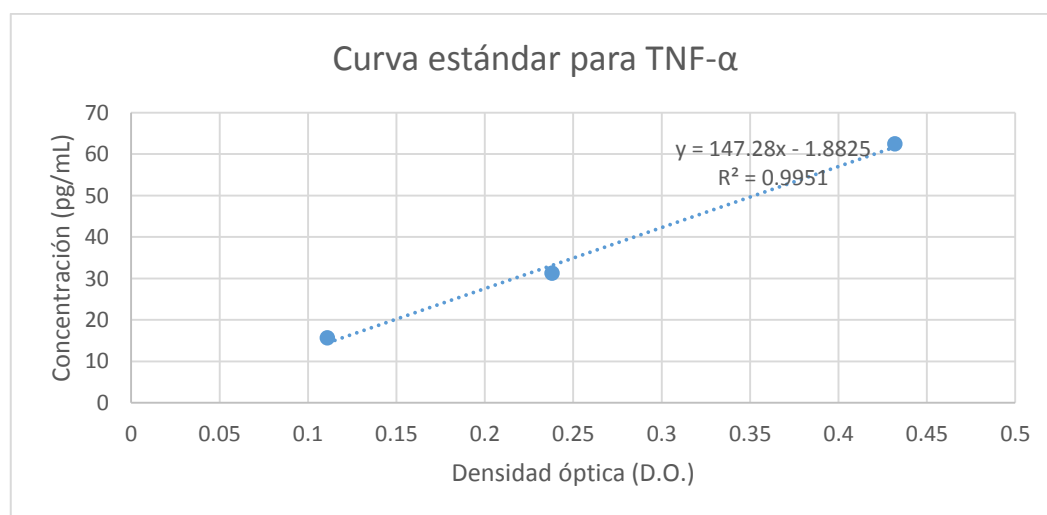
EDTA 0.5 M (pH 8.0).....40 mL

Ajustar el volumen final a 1 litro con agua desionizada.

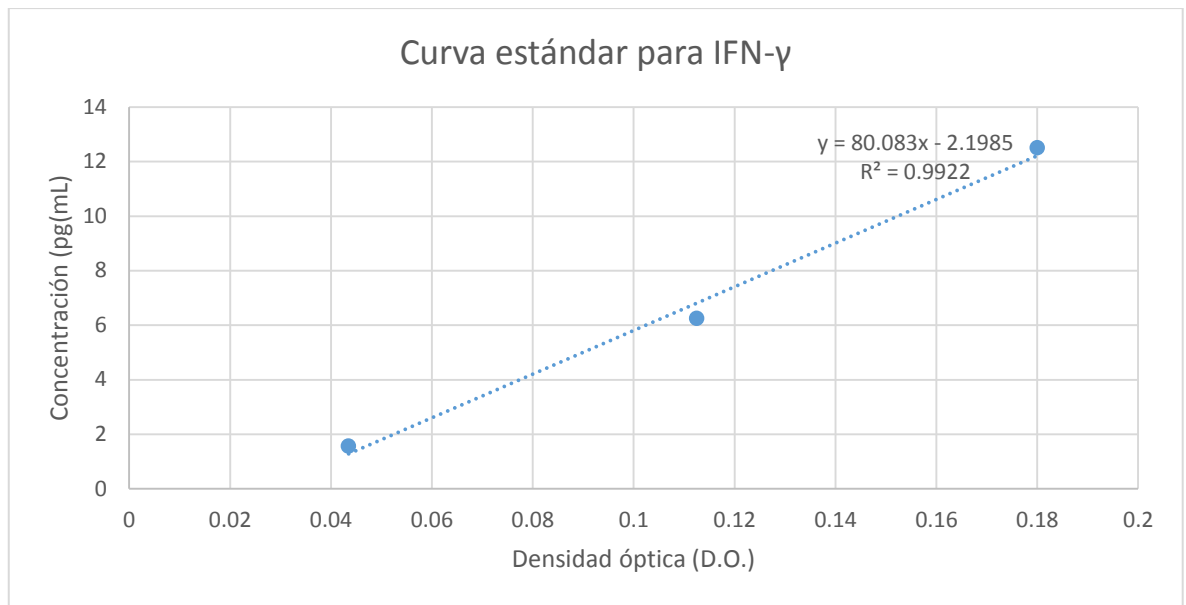
Para preparar una solución de trabajo 1 X a partir del buffer stock 10X, mezclar el buffer 10X de reserva con agua desionizada o tridestilada sin ADNasa en una proporción de 1:9.

**ANEXO 9.** Elaboración de reactivos y curvas estándar de los kits de ELISA para detección de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2.

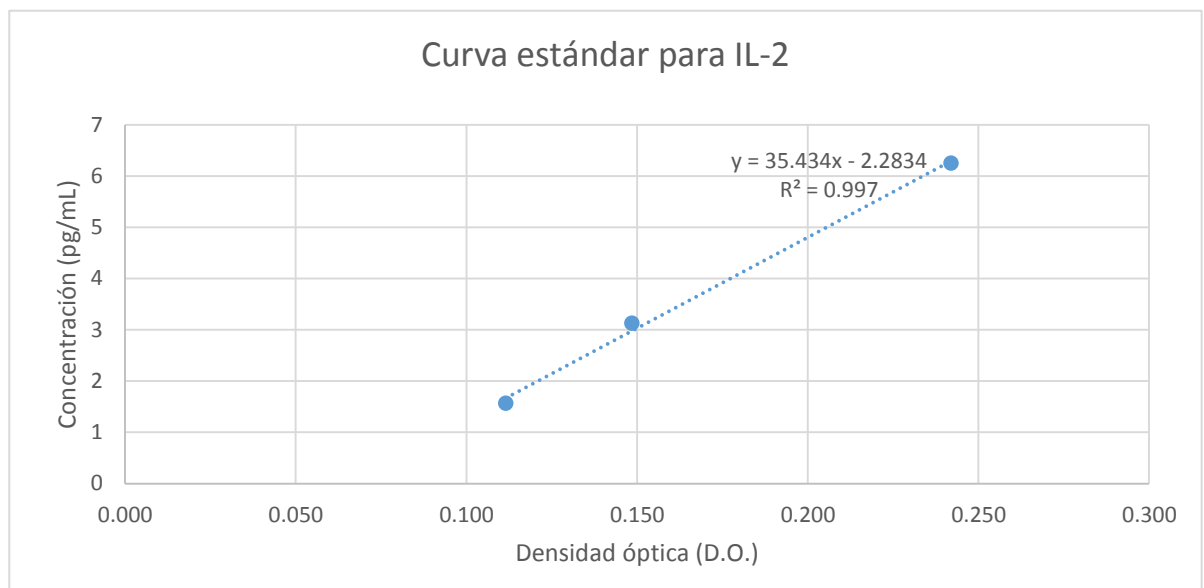
### A) Curva estándar para TNF- $\alpha$



B) Curva estándar para IFN-γ



C) Curva estándar para IL-2.



**ANEXO 10.** Determinación taxonómica del alga parda *Lessonia trabeculata*, hecha por el Herbario de la Universidad Nacional Agraria La Molina.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
Departamento Académico de Biología

La Molina, 02 de marzo de 2017

**CONSTANCIA**

03-2017-HM-UNALM

Mediante la presente se informa que la muestra de alga proveniente de la Bahía de San Nicolás, distrito de Marcona, provincia de Nazca, departamento de Ica, recolectada por Eder Valdir Apumayta Suárez, correspondiente al proyecto “Desarrollo e implementación de procesos tecnológicos de validación analítica y bioactiva para fucoidano de algas pardas como suplemento nutricional para humanos”; convenio 143-PNICP-PIAP-2015, ha sido estudiada en el Herbario “A. Weberbauer” del Dpto. de Biología (MOL) de la Universidad Nacional Agraria La Molina para su determinación taxonómica. El examen y reconocimiento de los caracteres morfológicos de orden cualitativo y cuantitativo en dicho espécimen permiten concluir que el mismo corresponde a la siguiente especie:

**Especie**

*Lessonia trabeculata* Villouta & Santelices

**Familia**

Lessoniaceae

Atentamente,

Mercedes Flores Pimentel  
Jefe  
Herbario “A. Weberbauer” (MOL)  
Dpto. de Biología, Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Agraria La Molina



## ANEXO 11. Resumen de resultados

Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas se muestran en las siguientes tablas, tomando como referencia el grupo control tratado con solución salina, a fin de ser más comprensibles.

RIP	Inmunidad innata					Inmunidad adaptativa	
	NO	ERO	TNF- $\alpha$ suero	TNF- $\alpha$ expresión	TNF- $\beta$ expresión	IFN- $\gamma$ suero	IL-2 suero
GE1	0	0	5	-1,3	1,5	8,5	-0,01
GE2	0	0	4	0,1	0,9	10	0,1

RIS	Inmunidad innata					Inmunidad adaptativa		
	NO	ERO	TNF- $\alpha$ suero	TNF- $\alpha$ expresión	TNF- $\beta$ expresión	IFN- $\gamma$ suero	IL-2 suero	IL-2 expresión
GE1	0	0	-5	1,1	1	10	-0,5	0,4
GE2	0	0	4	0,5	1,1	30	-0,7	1,5